

Zur Isolierung und Identifizierung der Sphingolipide aus Rinderhirn

von

SIEGFRIED WIELAND

1960

Zur Isolierung und Identifizierung der Sphingolipide

aus Rinderhirn

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Siegfried Wieland

aus

Göppingen

April 1960



Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1960

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Chemie der Sphingolipide	2
Allgemeiner Teil	8
Eigene Untersuchungen	8
A. Papierchromatographie der Sphingolipide	8
B. Darstellung der Sphingolipide aus dem Rinderhirn	13
C. Auftrennung des vorgereinigten Lipoidgemisches	17
Multiplikative Verteilung der Sphingolipide	18
D. Identifizierung der Sphingolipide	25
E. Grenzen des papierchromatographischen Nachweises der Sphingolipide	37
F. Untersuchung der grauen und weißen Substanz des Rinderhirns	39
Experimenteller Teil	40
A. Papierchromatographie der Sphingolipide	40
B. Darstellung der Sphingolipide aus dem Rinderhirn	43
C. Isolierung der Sphingolipide	47
D. Identifizierung der Sphingolipide	51
E. Papierchromatographische Untersuchung der grauen und weißen Substanz des Rinderhirns	56
F. Vergleichssubstanzen für die Papierchromatographie	57

E i n l e i t u n g

Die Verwendung von Lipoidextrakten zur Behandlung der vegetativen Dystonie und der Gebrauch als Therapeutikum in der Rekonvaleszenz verlangt einwandfreie Methoden, um die einzelnen Präparate qualitativ und quantitativ auf ihre Inhaltsstoffe zu untersuchen.

In einer vor kurzem an unserem Institut durchgeführten Arbeit hat G. RICHTER¹⁾ versucht, für die Gruppe der Phosphatide entsprechende Methoden auszuarbeiten. Diese führten zur Entwicklung eines neuen papierchromatographischen Verfahrens, das mit der Craig-Verteilung kombiniert, das Problem der Phosphatidanalyse weitgehend lösen konnte.

Noch nicht berücksichtigt wurde in diesen Untersuchungen die Stoffgruppe der Sphingolipide, die vor allem als Bestandteile der Nervensubstanz für den Aufbau dieser Zellen von großer Wichtigkeit sind.

Die Anreicherung gewisser Sphingolipide bei verschiedenen Formen der Idiotie bestätigt, daß diese Verbindungen auch eine spezielle Stoffwechselwirkung besitzen müssen.

E. HECHT und Mitarbeiter²⁾ fanden außerdem, daß Sphingolipide als Hemmstoffe der Blutgerinnung anzusehen sind.

Vor kurzem konnte R. KUHN³⁾ zeigen, daß die Ganglioside als Virusakzeptoren eine wichtige Rolle spielen.

Im einzelnen soll mit der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, auch für die Sphingolipide eine qualitative papierchromatographische Trennmethode auszuarbeiten und mit deren Hilfe ein übersichtliches Isolierungsverfahren für die Verbindungen dieser Stoffgruppe zu entwickeln.

1) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

2) E.HECHT, R.H.LANDABURU, M.H.CHO u. W.H.SEEGERS, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 307, 263 (1957)

3) R.KUHN, Naturwissenschaften 46, 43 (1959)

Chemie der Sphingolipide

Die erste Einteilung der gesamten Lipide nach chemischen Gesichtspunkten wurde von W. R. BLOOR⁴⁾⁵⁾ vorgenommen. Er unterschied einfache, zusammengesetzte und abgeleitete Lipide. Die uns interessierenden Lipide gehören zur zweiten Gruppe. Innerhalb dieser Gruppe wurden die Cerebroside, Ganglioside und das Sphingomyelin von H. E. CARTER und Mitarbeitern⁶⁾ unter der Bezeichnung S p h i n g o l i p i d e zusammengefaßt. Diese Substanzen enthalten als gemeinsamen Baustein das Sphingosin.

S p h i n g o s i n (Abb. 1) enthält als funktionelle Einheiten zwei Hydroxylgruppen und eine Aminogruppe, die dem Molekül basische Eigenschaften verleiht. Die Aufklärung der Konstitution durch E. KLENK⁷⁾ führte zu einem Fettalkohol mit achtzehn C-Atomen. H. E. CARTER und Mitarbeiter⁸⁾ bewiesen für Sphingosin die Struktur eines erythro-1,3-Dihydro-2-amino-4-trans-octadecens (Abb. 1).

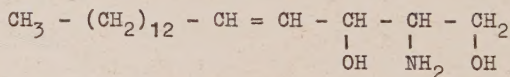


Abb. 1

Sphingosin

Alle Sphingolipide zeigen, was die Lösungsverhältnisse und Resistenz gegenüber Alkali betrifft, große Ähnlichkeit, eine Eigenschaft, die wohl darauf beruht, daß sie die Fettsäureamidgruppierung des Sphingosins enthalten.

4) W.R.BLOOR, Chem.Reviews 2, 243 (1925)

5) W.R.BLOOR, "Biochemistry of the Fatty Acids and their Compounds, the Lipids", New York 1943, S. 1 u. 2

6) H.E.CARTER, F.J.GLICK, W.P.NORRIS u. G.E.PHILLIPS, J.biol. Chemistry 142, 449 (1942)

7) E.KLENK, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 185, 169 (1929); ref. C.A. 24, 859 (1930)

8) H.E.CARTER, W.P.NORRIS, F.S.GLICK u. G.E.PHILLIPS u. R.HARRIS, J.biol.Chemistry 170, 269 (1947)

Sphingomyelin (Abb. 2) wurde von J. W. L. THUDICHUM erstmals⁹⁾ im Gehirn gefunden. Die erste Strukturformel schlug P. A. LEVENE¹⁰⁾ vor, die jedoch von H. E. CARTER und Mitarbeitern¹¹⁾ geändert wurde.

Bei der Hydrolyse entstehen neben Fettsäuren und Phosphorsäure die beiden Stickstoffbasen Cholin und Sphingosin¹²⁾. Als Fettsäure kommt vor allem Lignocerinsäure $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$ vor, daneben in verschiedenen Geweben Stearinsäure oder Nervonsäure¹³⁾. Höher ungesättigte Säuren, die für die Glycerophosphatide des Gehirns charakteristisch sind, fehlen.

Die Fettsäuren liegen in Amidbindung vor, während die endständige Hydroxylgruppe des Sphingosins mit der Cholinphosphorsäure verestert ist.

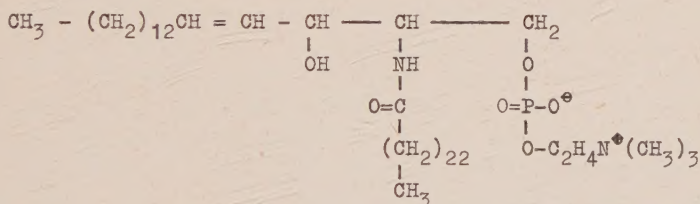


Abb. 2

Sphingomyelin

Bei den Cerebrosiden unterscheidet man zwei Untergruppen, Galaktolipide und Glycolipide, je nachdem, ob bei der Hydrolyse d(+)-Galaktose oder d(+)-Glukose abgespalten wird.

Von den Galaktolipiden sind vier Vertreter bekannt, die im Molekül Galaktose, Sphingosin und eine für ihre Art spezifische Fettsäure enthalten. Die Fettsäure ist ähnlich wie im Sphingomyelin durch eine Säureamidbindung befestigt. Die Galaktose ist mit ihrer Aldehydgruppe an das endständige

-
- 9) J.W.L.THUDICHUM, "A Treatise on the Chemical Constitution of Brain", London 1884
 10) P.A.LEVENE, J.biol.Chemistry 24, 69 (1916)
 11) H.E.CARTER, F.J.GLICK, W.P.NORRIS, G.E.PHILLIPS, J.biol.Chemistry 142, 449 (1942)
 12) H.E.CARTER u. Mitarb. J.biol.Chemistry 170, 285 (1947);
 ibid. 191, 727 (1951); J.Amer.chem.Soc. 75, 1007 (1953)
 13) S.J.THANNHAUSER, N.F.BONGODDO, J.biol.Chemistry 172, 141 (1948)

Hydroxyl gebunden¹⁴⁾, so daß eine nicht reduzierende Verbindung zustande kommt.

Von den vier Vertretern des Galaktolipidtyps enthält K e r a s i n (Abb. 3), von J. L. W. THUDICHUM¹⁵⁾ aufgefunden, Lignocerinsäure $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$ als charakteristische Fettsäure.

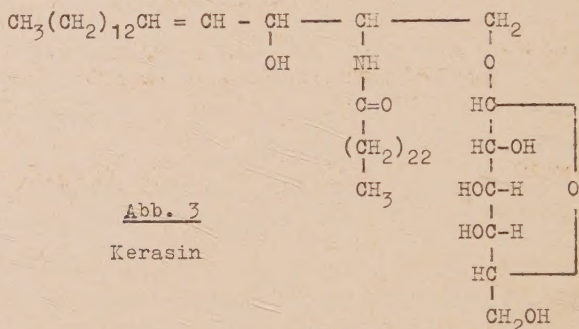


Abb. 3
Kerasin

Phrenosin (Abb. 4), ebenfalls durch J. L. W. THUDICHUM¹⁵⁾ entdeckt, führt α -Hydroxylignocerinsäure $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{CHOH COOH}$ (auch Cerebronsäure genannt) wie E. KLENK¹⁶⁾ und H. E. CARTER¹⁷⁾ zeigen konnten.

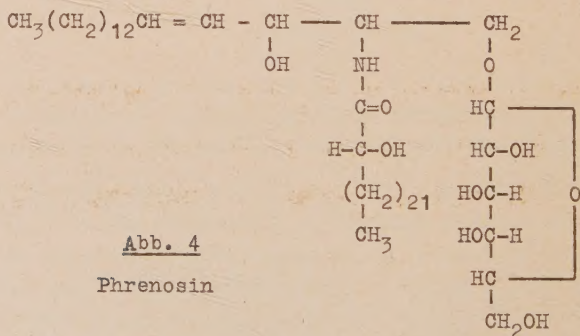


Abb. 4
Phrenosin

- 14) H.E.CARTER u.F.L.GREENWOOD, J.biol.Chemistry 199, 283 (1952)
 15) J.L.W.THUDICHUM, "Researches on the Chemical Constitution of the Brain", Report of the Medical Officer of the Privy Council and Local Government Board 3, No.5, 113-247 (1874)
 16) E.KLENK, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 179, 312 (1928)
 17) H.E.CARTER u.F.L.GREENWOOD, J.biol.Chemistry 199, 283 (1952)

Das dritte Cerebrosid, N e r v o n (Abb. 5), welches von E. KLENK¹⁸⁾ isoliert wurde, enthält als Fettsäurekomponente eine 15,16-Tetracosensäure $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$.

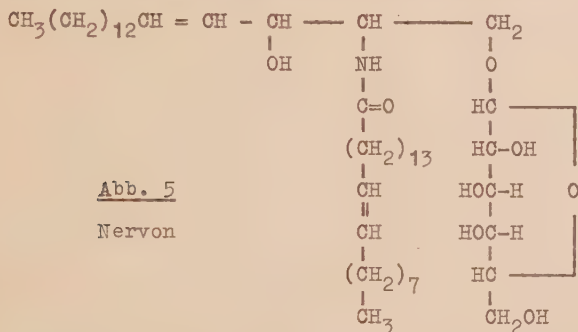


Abb. 5

Nervon

Die letzte Verbindung der bis jetzt bekannt gewordenen Cerebroside ist das O x y n e r v o n (Abb. 6), das ebenfalls von E. KLENK¹⁹⁾ aufgefunden wurde, mit einer α -Hydroxynervonsäure $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{CHOH COOH}$ im Molekül. Es wurde jedoch noch nicht in reiner Form dargestellt.

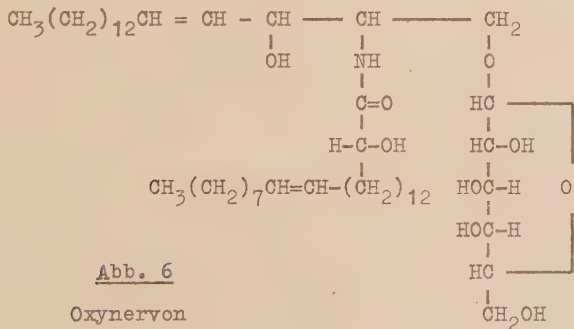


Abb. 6

Oxynervon

18) E.KLENK, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 145, 244 (1925)

19) E.KLENK, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 174, 214 (1928)

Bei den G l y c o l i p i d e n treten wahrscheinlich Cerebrosidarten auf, die den Galaktolipiden entsprechend gebaut sind. Bis jetzt wurde nur von einem dem Kerasin entsprechenden Glycolipid berichtet²⁰⁾.

Als einzige unter den Sphingolipiden gehen die Cerebroside eine sehr stabile Verbindung mit Schwefelsäure ein, sie bilden sogenannte Sulfatide. Ein Cerebrosid-schwefelsäureester wurde das erste Mal durch A. BLIX²¹⁾ aus Rinderhirn isoliert. Seine Bestandteile wurden als Cerebronsäure, Sphingosin, Galaktose und Schwefelsäure beschrieben. Die Aufklärung der Verknüpfung der Schwefelsäure mit dem Cerebrosidmolekül gelang S. J. THANNHAUSER und Mitarbeitern²²⁾. Durch vollständige Methylierung des Cerebrosid-schwefelsäureesters und anschließende Identifizierung der abgespaltenen Methylgalaktose konnten sie beweisen, daß die Schwefelsäuregruppe im Cerebrosid-schwefelsäureester mit dem ersten Hydroxyl des Galaktosemoleküls verestert ist, so daß man zum Formelbild 7 gelangt.

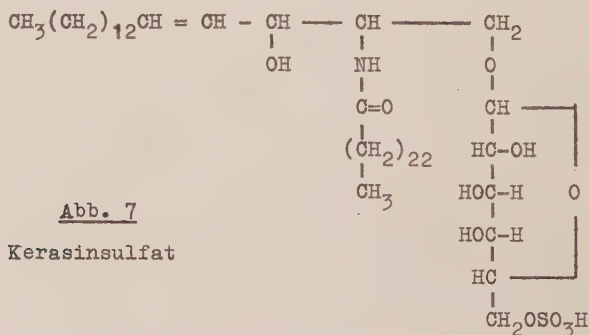


Abb. 7

Kerasinsulfat

Von den G a n g l i o s i d e n ist eine endgültige Strukturformel noch nicht gefunden worden. Bei der Hydrolyse von Hirngangliosiden entstehen Sphingosin, höhere Fettsäuren ($> \text{C}_{18}$), Hexosen (hauptsächlich Galaktose und Glukose) und eine Polyhydro-

20) N.HALLIDAY, H.J.DEUEL jr., L.J.TRAGEMANN u. W.E.WARD, J.biol. Chemistry 132, 171 (1940)

21) A.BLIX, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 219, 82 (1933)

22) S.J.THANNHAUSER, J.FELLIG u. G.SCHMIDT, J.biol.Chemistry 215, 211 (1955)

xyaminsäure, die als Neuraminsäure bezeichnet wird²³⁾²⁴⁾. E. KLENK und Mitarbeiter²⁵⁾ geben für die N-Azetylneuraminsäure (= Sialinsäure) die in Abbildung 8 dargestellte Formel an, während J. W. CORNFORTH und Mitarbeiter²⁶⁾ für eine synthetisierte N-Azetylneuraminsäure mit denselben Eigenschaften eine in Abbildung 9 gezeigte Formel vorschlagen.

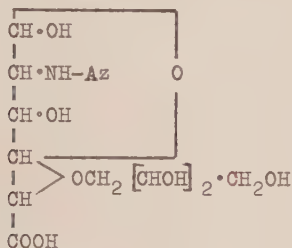


Abb. 8

N-Azetylneuraminsäure
(=Sialsäure) nach E.Klenk

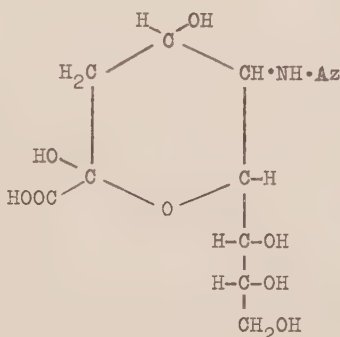


Abb. 9

N-Azetylneuraminsäure
nach J. W. Cornforth

Die Reihenfolge der einzelnen Bestandteile soll nach L. SVENNERHOLM²⁷⁾ folgende sein:

Fettsäure - Sphingosin - Hexose - Hexose - Chondrosamin - Neuraminsäure

23) E.KLENK, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 273, 76 (1942)

24) E.KLENK, *ibid.* 295, 164 (1953)

25) E.KLENK, H.FAILLARD, F.WEYGAND u. H.H.SCHÖNE, *ibid.* 304, 35 (1956)

26) J.W.CORNFORTH, M.E.DAINES u. A.GOTESCHALK, Proc.chem.Soc. 25 (1957)

27) L.SVENNERHOLM, Nature (London) 177, 524 (1956)

Allgemeiner Teil

Eigene Untersuchungen

Bei der Darstellung der Sphingolipide aus dem Rinderhirn hielten wir uns an die Vorschriften von H. DEBUCH²⁸⁾ und H. THIERFELDER²⁹⁾ mit teilweisen Abänderungen nach L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern³⁰⁾.

Zur Überwachung der Isolierungsarbeiten wurden bis jetzt als indirekte Methode Stickstoff-, Phosphor-, Aminostickstoff- und Zuckerbestimmungen durchgeführt. Dieses Verfahren weist zwei Nachteile auf. Erstens sind die Bestimmungen sehr langwierig und zweitens ergeben sie keine genaue Übersicht über die tatsächlich vorhandenen Lipide. Unsere erste Aufgabe bestand demnach darin, eine für die Sphingolipide geeignete Nachweismethode zu finden.

Nach den guten Erfahrungen, die wir bei der Identifizierung von Phosphatiden mit Hilfe der Papierchromatographie machten³¹⁾, lag es nahe, auch den Nachweis der Sphingolipide papierchromatographisch durchzuführen.

A. Papierchromatographie der Sphingolipide

1. Methode

a) Versuche, die Sphingolipide mit unbehandeltem Chromatographiepapier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 b Gl und Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5), sowie mit Silikatpapier nach C. H. LEA und D. N. RHODES³²⁾ und Chloroform-Methanol (3+1) als Laufmittel zu trennen, ergaben keine befriedigenden Ergebnisse.

Das von O. ARMBRUSTER und U. BEISS³³⁾ vorgeschlagene Laufmittel Diisobutylketon-Methylisobutylketon-Methyläthylketon-Chloroform-Ameisensäure(85%) (30+26+20+110+35) bewirkte bei auf-

28) H. DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)

29) H. LOENING u. H. THIERFELDER, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 68, 464 (1910)

30) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. J. HÜLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)

31) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. G. RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

32) C. H. LEA u. D. N. RHODES, Biochem.J. 60, 353 (1955)

33) O. ARMBRUSTER u. U. BEISS, Z.Naturforsch. 13b, 79 (1958)

steigender Chromatographie auf unbehandeltem Papier eine deutliche Trennung von Phosphatidylcholin ($R_F = 0,54$) und Sphingomyelin ($R_F = 0,42$). Der große Nachteil lag jedoch darin, daß die Laufhöhen der übrigen Phosphatide und Sphingolipide kaum differierten und die Aminosäuren und Lipoidbruchstücke am Startpunkt zurückblieben und somit nicht zu identifizieren waren. Außerdem war der Nachweis von Ninhydrinpositiven Lipoiden durch dieses Laufmittel empfindlich gestört, so daß auch größere Mengen nur noch als schwache Flecken auftraten. Geringe Mengen Rhodamin-positiver Substanz, die nach unserem Verfahren einwandfrei nachgewiesen werden konnten, erschienen bei der Anfärbung nicht mehr.

b) Die von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern³⁴⁾ beschriebene, über 20 cm aufsteigende Chromatographie für Phosphatide auf Formaldehydpapier mit Butanol-Eisessig-Wasser erwies sich zur Auftrennung als geeignet.

Wie aus Tabelle 1, Chromatogramm 1 (S. 11) zu entnehmen ist, lagen die zu isolierenden Sphingolipide bei der Verwendung von Butanol-Eisessig-Wasser oberhalb oder bei $R_F = 0,5$, mit Ausnahme der Ganglioside, die kurz nach dem Startpunkt hängenblieben. Hinderlich für die eindeutige Identifizierung der Sphingolipide war, daß die noch als Verunreinigungen vorliegenden Phosphatide (Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin) ebenfalls oberhalb des R_F -Wertes 0,5 lagen. Um die Trennung der Phosphatide und Sphingolipide zu verbessern, führten wir Versuche mit verschiedenen Laufmitteln durch. Eine Verbesserung brachte ein Gemisch aus Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25). Die bei aufsteigender Chromatographie erzielten R_F -Werte sind aus Tabelle 1, Chromatogramm 2 ersichtlich. Die Laufhöhen wurden mit diesem modifizierten System im Vergleich zum normalen Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch gesenkt. Eine Ausnahme bildeten hierbei die beiden Ganglioside, deren R_F -Werte anstiegen, wodurch wir sie deutlich trennen konnten. Die Auftrennung von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin mit Hilfe der aufsteigenden Chromatographie gelang uns bis jetzt noch nicht.

34) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u.G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

c) Wir chromatographierten absteigend über eine Strecke von 50 cm, und zwar im System Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25). Das Ergebnis war noch nicht zufriedenstellend, obwohl schon eine bessere Trennung eintrat. Eine Modifizierung des Laufmittels mit Dibutyläther brachte den gewünschten Erfolg. Wie Tabelle 1, Chromatogramm 4 zeigt, hat nun Phosphatidylcholin einen R_F -Wert von 0,5 und Sphingomyelin einen R_F -Wert von 0,4; beide lassen sich auch in Rohextrakten einwandfrei trennen. Wird zu viel Substanz aufgetragen, so tritt eine Schwanzbildung vom höherlaufenden Phosphatidylcholin zum Sphingomyelin ein. Der in die Länge gezogene Fleck ist mit Rhodamin, jedoch nicht mit Phosphormolybdänsäure anfärbbar. Läßt man die etwa 15 Stunden laufenden Chromatogramme weitere 5 bis 7 Stunden durchlaufen, so treten Phosphatidylcholin und Sphingomyelin noch weiter auseinander.

Bei der Überwachung der Isolierungsarbeiten verwendeten wir für Gesamtextrakte die absteigende Methode. Wurde Phosphatidylcholin während der Isolierung entfernt, so fertigten wir aus Zeitersparnis nur mehr aufsteigende Chromatogramme an.

In T a b e l l e 1 wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AS = Aminosäuren	LPS = Lyso-Phosphatidylserin
Cb = Cerebroside	MPI = Monophosphoinositid
DPI = Diphosphoinositid	PÄ = Phosphatidyläthanolamin = Choleaminkephalin
FS = Fettsäuren	PC = Phosphatidylcholin = Lecithin
Gg = Ganglioside	PS = Phosphatidylserin
LPA = Lyso-Phosphatidyl- äthanolamin	SM = Sphingomyelin
LPC = Lyso-Phosphatidyl- cholin	

Tabelle 1

Laufhöhen der Sphingolipide in verschiedenen Lösungsmittelsystemen

FS Neutralfett Cholesterin ^{0,9}	FS Neutralfett Cholesterin ^{0,9}	FS Neutralfett Cholesterin ^{0,9}	FS Neutralfett Cholesterin ^{0,9}
Cb ^I 0,86	Cb ^I 0,85		
PC 0,78		Cb ^I 0,79	
SM, PA 0,76		PA 0,76	Cb ^I 0,75
		PC 0,75	
LPC 0,69		SM 0,71	
Cb ^{II} 0,60	Cb ^{II} 0,60		
PS 0,53	PC+PA 0,51	LPC 0,55	PA 0,54
	+SM -0,56		PC 0,50
	LPÄ 0,48	LPÄ 0,51	
LPI 0,42	LPC 0,45	Cb ^{II} 0,46	Cb ^{II} 0,45
		PS 0,46	
	PS 0,38		SM 0,40
		MPI 0,35	
DPI 0,24			LPÄ 0,26
		Gg I 0,22	LPC 0,24
	Gg I 0,17	Gg II 0,10	
	Gg II 0,09		
GgI+II 0,05			PS 0,05
			GgI+II 0,02

Chromatogramm 1

Chromatogramm 2

Chromatogramm 2

Chromatogramm 4

Butanol-Eisessig-
Wasser
aufsteigend

Pyridin-Butanol-
Wasser
aufsteigend

Butanol-Eisessig-
Wasser+Äther
aufsteigend

Pyridin-Buta-
nol-Wasser +
Dibutyläther
absteigend

2. Färbemethoden für Sphingolipide

Zum Nachweis der Sphingolipide färbten wir, wie schon C. H. LEA und Mitarbeiter³⁵⁾ und O. ARMBRUSTER und U. BEISS³⁶⁾ empfohlen haben, nacheinander mit Ninhydrin, Phosphormolybdänsäure und Rhodamin B an (Tabelle 2, 1-3). Reichten diese Anfärbungen zur Charakterisierung vor allem für Phosphatide, Zucker und Fettsäuren nicht aus, so wurden die in Tabelle 2 unter 4. bis 9. aufgeführten Färbungen zusätzlich angewendet. Anfärbungen mit Nilblau³⁷⁾ und Amidoschwarz 10 B waren für den Sphingolipidnachweis nicht empfindlich genug (siehe Seite 38).

T a b e l l e 2

Nr.	Reagenz	reagierende Substanz	Farbe bei Tageslicht	Literatur
1.	Ninhydrin	NH ₂ haltige Subst.	violett	38
2.	Phosphormolybdänsäure	cholinhaltige Lipide	blau	39
3.	Rhodamin B	Lipide	im UV rosa	40
4.	Malachitgrün	Lysophosphatide	Farbstoffzerstörung	41
5.	fuchsin-schweflige Säure	Plasmalogene	fuchsinrot	37
6.	Osmiumtetroxyd	ungesätt. Fettsäuren	schwarz	37
7.	Kupferazetat-Kaliumferrocyanid	Fettsäuren und Phosphatidylserin	braun	42
8.	ammoniakalische Silbernitratlg.	Zucker u. Inosit	schwarz	43
9.	Ammoniummolybdat-Perchlorsäure	phosphorhalt. Lip. u. Spaltprodukte	blau	44

- 35) C.H.LEA, D.N.RHODES u.R.D.STOLL, Biochem.J. 60, 353 (1955)
 36) O.ARMBRUSTER u. U.BEISS, Z.Naturforsch. 13b, 79 (1958)
 37) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
 38) F.CRAMER, "Papierchromatographie", Weinheim/Bergstraße 1954
 39) L.DOUSTE-BLAZY, J.POLONOVSKI u. P.VALDIGUIE, C.R.hebd. Séances Acad.Sci., Paris 235, 1643 (1952); ref.C.A. 47, 5981a (1953)
 40) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Amer.chem.Soc. 77, 6668 (1955)
 41) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
 42) J.POKORNY, Naturwissenschaften 43, 375 (1956)
 43) H.F.LINSKENS, "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955
 44) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature (London) 164, 1107 (1949)

B. Darstellung der Sphingolipide aus dem Rinderhirn

Die Darstellung erfolgte nach bewährten Methoden (siehe S. 8). Mit Hilfe des entwickelten papierchromatographischen Verfahrens war es nunmehr möglich, innerhalb kurzer Zeit die qualitative Zusammensetzung der erhaltenen Fraktionen zu ermitteln. Eine maximale Auswertung des Extraktionsgutes und die Zusammenfassung gleicher Fraktionen für den weiteren Isolierungsgang war somit gewährleistet.

1. Vorextraktion zur Entfernung der Glyzerinphosphatide

Die Gehirne frisch getöteter Rinder wurden von anhaftenden Gewebeteilen befreit und unter weitgehendem Ausschluß von Licht und Sauerstoff zerkleinert. Wir entwässerten dreimal je zwei Tage mit Azeton. Anschließend extrahierten wir 15mal mit Azeton, nachfolgend in der gleichen Weise mit Äther.

Mit Hilfe der papierchromatographischen Untersuchungsmethode wurde die erfolgte Extraktion kontrolliert.

Im Azetonextrakt konnten wir N e u t r a l f e t t e , C h o l e s t e r i n , geringe Mengen I n o s i t und verschiedene A m i n o s ä u r e n , aber auch schon etwas P h o s p h a t i d y l c h o l i n , P h o s p h a t i d y l - ä t h a n o l a m i n und C e r e b r o s i d nachweisen.

Der Ätherextrakt enthielt P h o s p h a t i d y l ä t h a n o l a m i n , P h o s p h a t i d y l s e r i n , M o n o - p h o s p h o i n o s i t i d , A m i n o s ä u r e n , I n o s i t , anorganische P h o s p h a t e und geringe Mengen G a n g l i o s i d .

2. Extraktion der Sphingolipide

Das durch Extraktion mit Azeton und Äther vorbereitete Gehirn wurde nunmehr in eine Perkolatorsäule überführt, die auf konstanter Temperatur gehalten werden konnte. Zur möglichst vollständigen Entfernung der Phosphatide wurde nun mit k o - c h e n d e m Äther nachbehandelt. Hierauf wurde mit kochendem

Äthanol literweise ausgezogen. Die aufgefangene, heiße Lösung wurde auf etwa $1/4$ ihres ursprünglichen Volumens im Vakuum eingengt und einen Tag bei 0° C stehen gelassen. Die Mutterlauge enthielt kaum noch Sphingolipide, jedoch Zersetzungsprodukte und geringe Mengen Cholesterin. Sie wurde deshalb nicht weiter bearbeitet. Der Niederschlag wurde nochmals im Soxhlet einen Tag lang mit Äther extrahiert, um ätherlösliche Verunreinigungen zu entfernen.

Das erhaltene Gemisch roher Sphingolipide stellte eine weiße, wachsartige, pulverige Substanz dar, die sich auch nach längerem Lagern und Belüften nur unmerklich gelb verfärbte. Die papierchromatographische Untersuchung ergab als wesentliche Bestandteile Cerebroside, zwei Ganglioside und Sphingomyelin. Daneben waren als Verunreinigungen noch verhältnismäßig viel Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Aminosäuren und Zersetzungsprodukte, wenig Cholesterin und Phosphatidyläthanolamin nachzuweisen.

Die Auftrennung in Azeton-, Äther- und Äthanol-lösliche Bestandteile kann demnach nur als grobe Vorreinigung angesehen werden. Für die Reindarstellung der Sphingolipide ist jedoch die vollständige Abtrennung der Esterphosphatide notwendig.

3. Milde alkalische Hydrolyse der Rohsphingolipidfraktion

Unsere Versuche, die aus der Ätherfraktion stammenden Verunreinigungen durch Säulenchromatographie oder multiplikative Verteilung zu entfernen, verliefen nicht zufriedenstellend. Vor allem erwiesen sich Phosphatidylcholin und Lyso-Phosphatidylcholin als hartnäckige Verunreinigungen, die sich nicht von Sphingomyelin abtrennen ließen. Wir sahen uns deshalb gezwungen, durch milde alkalische Hydrolyse nach G. SCHMIDT, J. BENOTTI, B. HERSHMAN und S. J. THANNHAUSER⁴⁵⁾ die Verunreinigungen zu entfernen.

45) G.SCHMIDT, J.BENOTTI, B.HERSHMAN u. S.J.THANNHAUSER, J. biol.Chemistry 166, 505 (1946)

Die Rohsphingolipide wurden am Rückflußkühler mit 1n-methanolischer Kalilauge 24 Stunden lang bei 37° C unter starkem Rühren hydrolysiert. Schon nach einer halben Stunde war kein Phosphatidyläthanolamin mehr nachzuweisen, Spuren von Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin waren noch vorhanden. Neu entstanden war eine Substanz X, die auch der weiteren Hydrolyse standhielt. Nach 24stündiger Hydrolyse waren Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin nicht mehr nachzuweisen. Die Sphingolipide hatten, soweit dies auf dem Chromatogramm abzuschätzen war, die Hydrolyse gut überstanden. Die Amidbindung des Sphingosins wird demnach durch diese Methode nicht angegriffen. Die Hydrolyseflüssigkeit wurde mit n Salzsäure auf einen p_H -Wert von 7 gebracht, mit der doppelten Menge Wasser versetzt und im Vakuum der Großteil des Methanols abdestilliert. Das nach dem Abkühlen ausfallende weiße Pulver wurde abzentrifugiert, in Wasser nochmals aufgewirbelt und abermals zentrifugiert. Zum Schluß wurde die Substanz gefriergetrocknet. Wir sahen bewußt von einer Ausfällung mittels Trichloressigsäure, wie sie von G. Schmidt Verwendung findet, ab, da die Anwesenheit von Trichloressigsäure bei der Chromatographie der Sphingolipide Schwierigkeiten verursacht und aus der getrockneten Substanz nur sehr schwer zu entfernen ist.

Die Abtrennung der durch die Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte erfolgte mit Hilfe der Säulenchromatographie.

4. Säulenchromatographie der Sphingolipidfraktion nach der mild-alkalischen Hydrolyse

R.H. SMITH⁴⁶⁾ beschreibt eine verteilungschromatographische Methode an einer Zellolosesäule zur Entfernung von wasserlöslichen Bestandteilen aus der Hydrolyse. Als Elutionsflüssigkeit wird Chloroform-Äther-Wasser (80+20+2,5) verwendet. Zur Erhöhung der adsorptiven Kräfte benutzten wir anstelle von reiner Zellulose eine von uns mit Formaldehyd imprägnierte Zellulose (siehe S. 46). Das Eluieren erfolgte mit einer Mischung

46) R.H.SMITH, Biochem.J. 57, 130 (1954)

aus Chloroform-Methanol-Wasser (80+20+2,5). Die wasserlöslichen Substanzen und alle mit Ninhydrin anfärbbaren Spaltprodukte verblieben in der Säule und konnten mit Alkohol und Wasser nachträglich eluiert werden.

Mit Hilfe der milden alkalischen Hydrolyse und der anschließenden Reinigung an einer Formaldehydzellulosesäule erhielten wir, wie aus dem Chromatogramm (Abb.10) zu entnehmen ist, eine Substanz, die frei von Verunreinigungen aus der Kephalinfraktion war. Das weiße, sich an der Luft und dem Licht nur mehr unmerklich verändernde Pulver enthielt keine Aminosäuren mehr und war bis auf eine Substanz X ($R_f = 0,24$) frei von Spalt- oder Umwandlungsprodukten. Durch die Zerstörung

NF A B C

Cb^I 

? 

PK 

PS 

Cb^{II} 

SM 

Subst.X 

PS 

Gg + AS 

Abb. 10

A = Rohsphingolipide vor der milden alkalischen Hydrolyse

B = Sphingolipide nach der milden alkalischen Hydrolyse

C = Sphingolipide nach der Entfernung der Spaltprodukte mittels Verteilungschromatographie an einer Formaldehydzellulosesäule

Papier: Formalinpapier

Laufmittel: Pyridin-Butanol-Wasser
 (7+25+25)
 20 Teile Oberphase

Dibutyläther 5 Teile

Methode: absteigend

Entwicklung: Ninhydrin

Phosphormolybdänsäure

XXXXXXXXXX

Rhodamin

-.-.-.-.-

des Phosphatidylcholins traten bei der nun anschließenden multiplikativen Verteilung keine Phasenverschiebungen und Löslichkeitsvermittlungen auf, was sonst bei Gegenwart von Phosphatidylcholin sehr störend in Erscheinung tritt. Es galt nun, als nächstes die einzelnen Komponenten des Gemisches durch ein geeignetes Verfahren aufzutrennen.

C. Auftrennung des vorgereinigten Lipoidgemisches

Die bis jetzt zur Auftrennung von Lipoiden, eines Rohextraktes oder eines vorgereinigten Lipoidextraktes angewandten Methoden beruhten hauptsächlich auf Lösungsunterschieden, obwohl diese bei Lipoiden bei weitem nicht so ausgeprägt sind wie bei anderen Stoffgruppen. Trotzdem wurden die ersten qualitativen Trennungen zwischen Cerebrosiden und Sphingomyelin unter großen Schwierigkeiten durch Fällungen erreicht⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾. Viele Verfahren zur Darstellung oder Vorreinigung der Sphingolipide arbeiten nach demselben Prinzip⁵⁰⁾⁵¹⁾.

Da jedoch schon geringe Beimengungen von Wasser oder von Lipoiden, vor allem von Lecithin, die Lösungsverhältnisse sehr stark verändern, versuchten viele Autoren diese Verunreinigungen durch Adsorption zu entfernen. So wurde das chromatographische Verhalten der Lipide an Kieselsäuresäulen⁵²⁾⁵³⁾⁵⁴⁾ und Florisilsäulen⁵⁵⁾ untersucht, wobei sich zeigte, daß Phospholipide abgetrennt wurden, Cholesterin oder Triglyceride jedoch nicht. Zudem blieben noch ca. 25% des Ausgangsmaterials in den Säulen zurück. Die Trennung von Sphingomyelin und Cerebrosiden gelang

47) H.LÖWNING u. H.THIERFELDER, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 68, 464 (1910)

48) O.ROSENHEIM, Biochem.J. 8, 110 (1914)

49) P.A.LEVENE, J.biol.Chemistry 18, 433 (1914)

50) E.KLENK u. F.RENNKAMP, Z.physiol.Chem. 267, 145 (1940)

51) M.LEES, J.FOLCH-PI, G.H.SLOANE u. S.S.CARR, J.Neurochem. 4, 9 (1959)

52) B.WEISS, J.biol.Chemistry 223, 523 (1956)

53) S.PAYNE u. B.S.PLATT, Proc.Nutr.Soc. 17, XVI (1956)

54) C.LONG u. D.A.STAPLES, Biochem.J. 73, 7p (1959)

55) N.S.RADIN, J.B.BROWN u. F.B.LAVIN, J.biol.Chemistry 215, 997 (1956)

durch Adsorption an Aluminiumoxyd⁵⁶⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾ und Magnesiumsilikat⁵⁹⁾⁶⁰⁾. Die Trennung von cholinhaltigem und cholinfreiem Material gelang durch eine Adsorption an Magnesiumoxyd⁶¹⁾. Zur Abtrennung von galaktosehaltigen Lipoiden wurden in den letzten Jahren auch Ionenaustauschersäulen verwendet⁶²⁾⁶³⁾⁶⁴⁾. Diese einfachen Adsorptionsmethoden wurden, da sie keine sauber zu reproduzierenden Werte lieferten, meist noch mit einer zweiten Methode gekuppelt. So wurde zur Entfernung von glycerinhaltigen Lipoiden entweder mit Kaliumäthylat umgeestert⁶⁵⁾ oder zur Entfernung der Glycerophosphatide eine milde alkalische Hydrolyse durchgeführt⁶⁶⁾⁶⁷⁾. Alle hier beschriebenen Verfahren ergaben selten größere Mengen reiner Lipide. Sie waren außerdem sehr schwer zu reproduzieren. Wir versuchten daher eine Verbesserung der Isolierungsmethoden mit Hilfe der multiplikativen Verteilung nach L. C. CRAIG⁶⁸⁾.

Multiplikative Verteilung der Sphingolipide

Die bis jetzt durchgeführten multiplikativen Verteilungen beschränkten sich auf die Phosphatide. Zu erwähnen sind hier vor allem die Arbeiten von J. A. LOVERN und Mitarbeitern⁶⁹⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾, P. G. COLE und Mitarbeitern⁷²⁾⁷³⁾ und E. KLENK und Mitarbeitern⁷⁴⁾⁷⁵⁾. Durch Verwendung einer hochstufigen Craig-Ver-

- 56) S.J.THANNHAUSER u. P.SETZ, J.biol.Chemistry 116, 527 (1936)
- 57) E.KLENK, F.LEUPOLD, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 281, 208 (1944)
- 58) S.J.THANNHAUSER u. N.F.BONGODDO, Feder.Proc. 12, 280 (1953)
- 59) N.S.RADIN u. J.R.BROWN, Feder.Proc. 14, 266 (1955)
- 60) N.S.RADIN, F.B.LAVIN u. J.R.BROWN, J.biol.Chemistry 217, 789 (1955)
- 61) A.TAUROG, C.ENTENMANN, B.A.FRIES u.J.L.CHAIKOFF, J.biol.Chemistry 155, 19 (1944)
- 62) N.S.RADIN, F.B.LAVIN u. J.R.BROWN, *ibid.* 217, 789 (1955)
- 63) N.S.RADIN, J.R.BROWN u.F.B.LAVIN, *ibid.* 219, 977 (1956)
- 64) N.S.RADIN, F.B.MARTIN u. J.R.BROWN, *ibid.* 224, 499 (1957)
- 65) E.KLENK u. F.RENNKAMP, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 267, 145 (1940)
- 66) S.J.THANNHAUSER u.N.F.BONCODO, J.biol.Chemistry 172,141(1948)
- 67) R.M.C.DAWSON, Biochim.biophysica Acta 14, 374 (1954)
- 68) L.C.CRAIG, J.biol.Chemistry 155, 519 (1944)
- 69) J.A.LOVERN, Biochem.J. 51, 464 (1952)
- 70) J.A.LOVERN u. J.OLLEY, Biochem.J. 54, 128 (1953)
- 71) J.A.LOVERN u. J.OLLEY, *ibid.* 55, 686 (1953)
- 72) P.G.COLE, G.H.LATHE u. C.R.J.RUTHVEN, Biochem.J. 55, 17 (1953)
- 73) P.G.COLE, G.H.LATHE u. C.R.J.RUTHVEN, *ibid.* 54, 449 (1953)
- 74) E.KLENK u. H.DEBUCH, Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem 299, 66 (1955)
- 75) E.KLENK, F.RENNKAMP u. ~~H.DEBUCH~~, *ibid.* 267, 145 (1940)

teilung mit einem geeigneten Verteilungssystem gelang auch die Isolierung reiner Phosphatide⁷⁶⁾⁷⁷⁾. Aus diesem Grunde wandten wir für die weitere Auftrennung der Sphingolipide eine multiplikative Verteilung an.

Die in Tabelle 3 zusammengefaßten, bis jetzt zur Auftrennung gebrauchten Lösungsmittelsysteme erwiesen sich in unserem Fall als zu wenig spezifisch. Das von J. A. LOVERN und J. OLLEY⁷⁸⁾ unter (1) benutzte System neigte zur Emulsionsbildung und ergab keine gute Trennung. Das unter (2) angeführte System trennte besser, ergab jedoch keine befriedigenden Ergebnisse. Das unter (3) angegebene, von P. C. COLE und Mitarbeitern⁷⁹⁾ gebrauchte System trennte gut und führte zu einer schnellen Phasentrennung. Diese dritte Methode gestattete eine Auftrennung, so daß eine chromatographische Übersicht über die insgesamt vorhandenen Lipide möglich ist. Für die Isolierung der Sphingolipide erwies sie sich jedoch nicht geeignet.

T a b e l l e 3

Nr.	Lipoidquelle	Lösungsmittelsystem	Literatur
1.	Ochsenhirn	Petroläther-Äthanol(85%) (1+1)	78
2.	Menschenhirn	CCl ₄ -Methanol-Wasser (62+35+3,15)	79
3.	Menschenhirn	Petroläther-CCl ₄ -Methanol-Wasser (31+31+35+3)	79

Die Vorversuche zur Ermittlung eines für die Verteilung der Sphingolipide geeigneten Systems wurden in einer 30stufigen Ganzglasapparatur für Handbetrieb, Größe 3 nach E. HECKER⁸⁰⁾ mit einem Phasenvolumen von je 10 ml durchgeführt. Das hierbei ermittelte günstigste Verteilungssystem wurde auf eine 160stufige, vollautomatische Gegenstromverteilungsapparatur nach F. A. v. METZSCH⁸¹⁾ mit einem Phasenvolumen von je 50 ml übertragen.

76) E.KLENK u.H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 299, 66 (1955)

77) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u.G.RICHTER, Biochem.Z. 322, 186 (1959)

78) J.A.LOVERN u. J.OLLEY, unveröffentlichte Beobachtungen.

79) P.G.COLE, G.H.LATHE u.C.R.J.RUTHVEN, Biochem.J. 54, 449 (1953)

80) E.HECKER, Chemie-Ing.-Techn. 25, 505 (1953)

81) F.A.v.METZSCH, Chemie-Ing.-Techn. 25, 66 (1953)

1. Erste multiplikative Verteilung (V_1) der Sphingolipidfraction

Wir verteilten 8 g Sphingolipide des nach der Reinigung über die Zellolosesäule erhaltenen Gemisches (siehe S. 17). Die Verteilung ging über 130 Stufen mit einem Phasenvolumen von je 50 ml. Das Lösungsmittelsystem bestand aus

Äther-Methanol-Petroläther(Sdp 35-50°)-Wasser (45+45+45+9).

Die Substanz zeigte während der ersten zehn Verteilungsschritte Unlöslichkeiten, die sich durch gelinges Erwärmen beheben ließen. Die weitere Verteilung verlief glatt, ohne Emulsionen, mit 1/2 bis 1minütiger Wartezeit.

Zur Chromatographie wurden je zwei Ober- und Unterphasen zusammengefaßt. Das Ergebnis der Verteilung ist in Abbildung 11 schematisiert wiedergegeben.

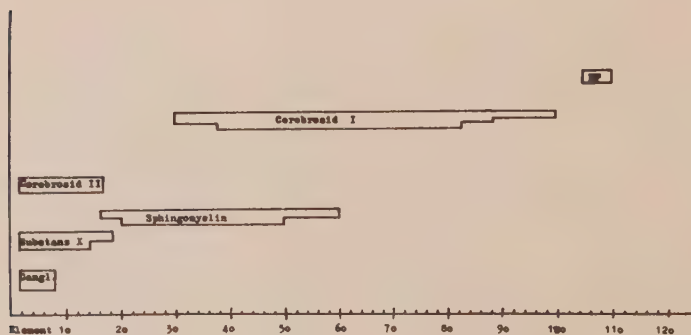
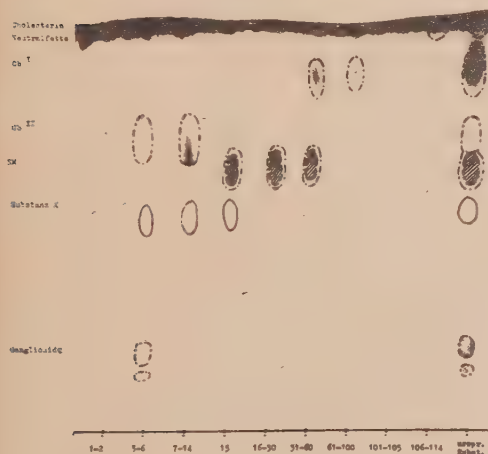


Abb. 11

Die Chromatogramme (siehe Abb. 12, S. 21) ließen die folgende Substanzverteilung feststellen. Die Elemente 1 - 6 enthielten zwei Ganglioside, Substanz X und Cerebrosid II. Die Phasen 7 - 14 führten die Hauptmenge von Cerebrosid II und Substanz X, die sich noch bis Glas 15 weiterverschob. In den Elementen 16 - 30 befand sich Sphingomyelin allein, ab Element 31 - 60 mit Cerebrosid I verge-

sellschaftet. Die Phasen 61 - 100 führen Cerebrosid I allein, die Gläser 101 - 105 sind leer, in den Elementen 106 - 115 waren Neutralfette und Spuren zersetzter Lipide nachzuweisen.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Elemente mit den Reinsubstanzen und die Elemente mit gemischten Substanzen zusammengefaßt. Wir erhielten aus der ersten Verteilung als Reinsubstanzen Cerebrosid I, aus Element 61 - 100 und Sphingomyelin aus den Elementen 16 - 30. Übrig blieben zwei Substanzgruppen, die zur weiteren Auftrennung kamen. Wir bezeichneten sie als Fraktion V_1/I , die aus den Elementen 3 - 14 stammte und zwei Ganglioside, Cerebrosid II und Substanz X enthält, sowie Fraktion V_1/II , die aus den Elementen 31 - 60 entnommen wurde und Sphingomyelin und Cerebrosid I enthielt. In Abbildung 13 (S. 22) sind die Chromatogramme der einzelnen erhaltenen Fraktionen aus der ersten Verteilung übersichtlich dargestellt.



Papier: Formalinpapier

Lösungsmittel:

PBW (7+25+25)

Methode: aufsteigend

Entwicklung:

Ninhydrin ————

Phosphomolybdänsäure

Rhodamin ————

Abb. 12

Chromatogramm der zusammengefaßten Fraktionen aus Verteilung V_1



Abb. 13

Chromatogramm der aus Verteilung V_1 erhaltenen und weiterverarbeiteten Substanzgruppen.

Papier: Formalinpapier

Laufmittel: PBW (7+25+25)

Methode: aufsteigend

Entwicklung: Ninhydrin

Phosphomolybdänsäure

///////

Rhodamin

2. Zweite multiplikative Verteilung (V_2) der Sphingolipidfraktion

Zur Auftrennung des aus der ersten multiplikativen Verteilung erhaltenen Gemisches von Cerebrosid II, Substanz X und den beiden Gangliosiden, als V_1/I bezeichnet (siehe Abb. 13) ermittelten wir in der Hecker'schen Apparatur ein Lösungsmittelsystem für eine zweite multiplikative Verteilung. Wir verteilten darin etwa 2 g im Vakuum getrocknete Substanz in der vollautomatischen Apparatur. Das Lösungsmittelsystem bestand aus:

Methanol-Chloroform-Petroläther (Sdp 35-50°)-Wasser (26+15+50+2).

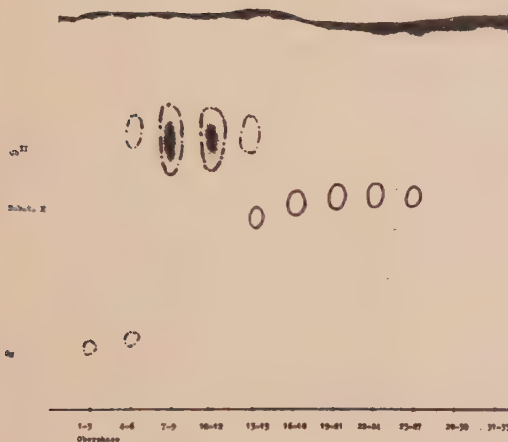
Wie sich bei den Vorversuchen ergeben hatte, bleibt die Substanz am Anfang der Verteilung liegen. Wir ließen deshalb 110 Oberphasen über 40 stationäre Unterphasen laufen. Da die Löslichkeit der Substanz in Ober- und Unterphase sehr verschieden ist, wurden diese getrennt chromatographiert. (Abb. 14 a und b)

Abb. 14

Chromatogramme der Ober- und Unterphasen von V_2

Papier: Formalinpapier
 Laufmittel: Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25)
 Methode: aufsteigend
 Entwicklung: Ninhydrin
 Phosphomolybdänsäure
 Rhodamin

—————
 ///////////////
 -.-.-.-.-



14a

Chromatogramm der
 Oberphase



14b

Chromatogramm der
 Unterphase

Es zeigte sich, daß die Hauptmenge der Sphingolipide in den Unterphasen lag, wie die Vorversuche schon gezeigt hatten. Die Oberphasen enthielten von Cerebrosid II und den Gangliosiden nur Spuren, während Substanz X über beide Phasen gleichmäßig verteilt war.

In der folgenden Tabelle und dem Übersichtsbild der Verteilung soll nun die Aufteilung erklärt werden.

T a b e l l e 4

Element	enthaltene Substanzen
1 - 3	2 Ganglioside
4 - 6	2 Ganglioside, Cerebrosid II
7 - 12	Cerebrosid II
13 - 15	Cerebrosid II, Substanz X
16 - 30	Substanz X

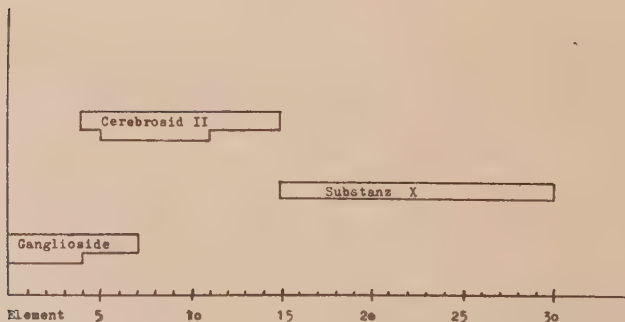


Abb. 15

Übersichtsbild der Verteilung V_2

Mit Hilfe der zweiten Verteilung erhielten wir somit als Reinsubstanzen die beiden Ganglioside und Cerebrosid II als Sphingolipide und Substanz X.

3. Fraktionierte Fällung der Mischfraktion (V_1/II) aus der ersten Verteilung

Aus der ersten Verteilung erhielten wir eine aus Cerebrosid I und Sphingomyelin bestehende Mischfraktion. Da sie einen erheblichen Teil der eingesetzten Substanz ausmachte, schlossen wir noch eine Auftrennung der beiden Substanzen durch eine fraktionierte Fällung an.

Die im Vakuum getrocknete Substanz wurde in Chloroform-Methanol gelöst und stehen gelassen. Das abgeschiedene weiße Pulver wurde abzentrifugiert. Es handelte sich um chromatographisch reines Cerebrosid I. Beim stärkeren Abkühlen der Mutterlauge schieden sich weiße, kugelige Substanzen an den Wänden ab. Sie bestehen ebenfalls aus reinem Cerebrosid I. In der Mutterlauge blieb ein mit Spuren Cerebrosid I verunreinigtes Sphingomyelin zurück.

Mit Hilfe der beiden multiplikativen Verteilungen und der fraktionierten Fällung ist es somit gelungen, für das Gemisch von zwei Gangliosiden, Sphingomyelin, Cerebrosid I und Cerebrosid II einen übersichtlichen, leicht reproduzierbaren Isolierungsgang zu finden. Dabei werden, nicht wie bei den meisten bis jetzt üblichen Trennverfahren, Sphingolipidsubstanzen verworfen oder unberücksichtigt gelassen. Die Isolierung von reinen Sphingolipiden wird dadurch wirtschaftlich und kann quantitativ verwertet werden.

D. Identifizierung der Sphingolipide

Zur Identifizierung der isolierten Sphingolipide wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt-

Nach einer allgemeinen Beurteilung der Eigenschaften der Substanz wurde nach dem auf Seite 9 beschriebenen Verfahren

chromatographiert und die in Tabelle 2 auf Seite 12 angegebenen Färbungen durchgeführt.

Ein IR-Spektrum wurde angefertigt und mit IR-Spektren authentischer Substanzen verglichen und diskutiert.

Zur Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung der Substanzen wurden Phosphor-, Schwefel-, Stickstoff- und Zuckerwerte bestimmt und eine CH-Bestimmung angefertigt.

Zur Feststellung der qualitativen Zusammensetzung wurden die Sphingolipide hydrolysiert und im Hydrolysat auf Zucker, Aminosäuren, Phosphorsäure und Fettsäuren geprüft.

Die Fettsäuren, als ätherlöslicher Hydrolyseanteil, wurden auf paraffiniertem Papier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 b Gl nach J. POKORNY⁸²⁾ und H. P. KAUFMANN und E. MOHR⁸³⁾ chromatographiert. Als Fließmittel dienten Eisessig, bzw. eine Paraffin-gesättigte Mischung von Essigsäure-Azeton-Wasser. Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren wurden mit Kupferazetat-Kaliumferrocyanid nachgewiesen, die ungesättigten Fettsäuren zusätzlich noch mit Osmiumtetroxyd. Zum Vergleich ließen wir Testsubstanzen mitlaufen.

Die wasserlöslichen Hydrolyseanteile chromatographierten wir aufsteigend über ca. 30 cm auf Schleicher- und Schüll-Papier 2043 b Gl und zwar:

zur Feststellung der Aminosäuren in Butanol-Eisessig-Wasser unter Anfärbung mit Ninhydrin,

zur Identifizierung der Zucker in Isopropanol-Eisessig-Wasser unter Sichtbarmachung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung,

zum Nachweis der phosphorhaltigen Produkte in Methanol-Isopropanol-Ammoniak unter Anfärbung mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure und Silbernitrat.

82) J. POKORNY, Naturwissenschaften 43, 375 (1956)

83) H. P. KAUFMANN u. E. MOHR, Fette, Seifen, einschl. Anstrichmittel 2, 165 (1958)

I. Identifizierung von Sphingomyelin

Die Substanz wurde aus den Elementen 16 bis 30 der ersten Verteilung als Reinsubstanz und mit wenig Cerebrosid I verunreinigt aus der Mutterlauge der fraktionierten Fällung erhalten.

- 1) Das Sphingomyelin war eine weiße, pulverige, manchmal schuppige, nicht hygroskopische Masse, die gegenüber Licht und Luft sehr stabil war. Es löste sich leicht in heißem Methanol, Äthanol und Eisessig, fiel jedoch zum größten Teil beim Abkühlen wieder aus. In einem Gemisch aus Methanol-Chloroform (3+2) war es in der Kälte leicht löslich. Völlig unlöslich war es in Äther und Azeton. Nach längerem, ungeschützten Lagern von Sphingomyelin war die Lösungsgeschwindigkeit stark verzögert.
- 2) Bei der papierchromatographischen Untersuchung mit verschiedenen Laufmitteln erhielten wir immer einen Fleck, der dieselbe Laufhöhe hatte, wie eine authentische Substanz. Bei aufsteigender Chromatographie in Pyridin-Butanol-Wasser lag der R_F -Wert bei 0,4, bei absteigender Chromatographie erhielten wir einen R_F -Wert von 0,51. In Tabelle 5 sind die durchgeführten Anfärbungen zusammengefaßt.

T a b e l l e 5

Substanz	Ninhydrin	Phos.Mo.	Rhod.B	Malachitgrün	fuchsin-schw.Sre	Ammon.molyb.	OsO ₄	Nilblau
isoliertes Sphingomyelin	-	+	+	+	-	+	-	+
authent. Sphingomyelin	-	+	+	+	-	+	-	+

- 3) Das IR-Spektrum (siehe Abb. 16, S. 28) ist durch die für Sphingolipide charakteristischen Säureamidbanden I und II bei 1550 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} gekennzeichnet, während eine für Esterphosphatide typische Bande bei 1730 cm^{-1} fehlt. Die Absorption bei 1250 cm^{-1} ist der P=O -Schwingung zuzuordnen,

die Bande bei 960 cm^{-1} entspricht teils einer trans CH=CH Konfiguration im Sphingosin, teils einer kovalenten Phosphatgruppe. In dem zum Vergleich aufgenommenen Sphingomyelin (siehe Abb. 17) sind noch Spuren an Esterphosphatiden enthalten, was die Bande bei 1730 cm^{-1} deutlich erkennen läßt.

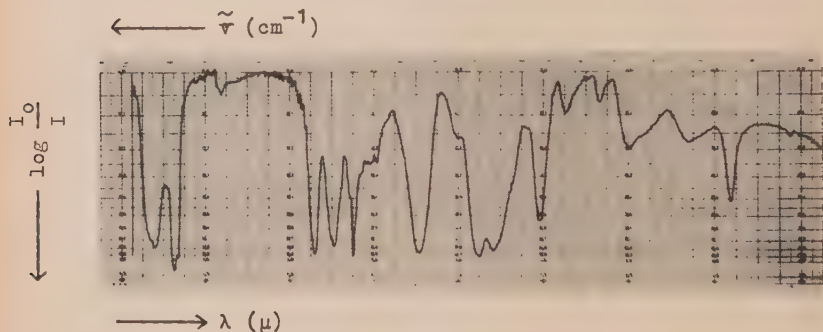


Abb. 16

IR-Spektrum des isolierten Sphingomyelins (gem. auf KBr-Scheibe)

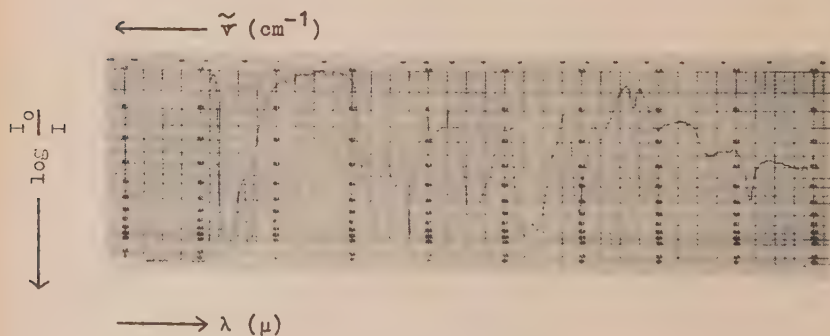


Abb. 17

IR-Spektrum von authentischem Sphingomyelin (gem. auf KBr-Scheibe)

- 4) Zur Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung wurden die in der folgenden Tabelle 6 zusammengefaßten Bestimmungen durchgeführt.

T a b e l l e 6

Substanz	% Phosphor	% Stickstoff	% C	% H
isoliert	-	-	65,82	10,90
berechnet*)	3,8	3,43	69,24	11,74
Literaturangaben ⁸⁴⁾	3,91	3,32	62,60	-

- 5) Die Hydrolyse mit 6n Kalilauge über 6 Stunden bei 100° erbrachte als ätherlösliche Bestandteile L i g n o c e r i n - und S t e a r i n s ä u r e . Im wäßrigen Anteil der Hydrolyse konnten wir S p h i n g o s i n und C h o l i n nachweisen. Wie zu erwarten war, trat beim Besprühen mit Silbernitrat keine Reduktion ein. Reduzierende Zucker waren also nicht enthalten.

II. Identifizierung der Substanz X

Die Substanz X wurde aus den Elementen 16 bis 30 der zweiten Verteilung (V₂) erhalten.

- 1) Es war eine bräunliche, klebrige Masse, die sich an der Luft sehr schnell dunkel verfärbte. Sie löste sich leicht in Äther; in Chloroform und Methanol dagegen erst nach längerem Schütteln.
- 2) Bei der papierchromatographischen Untersuchung konnten wir einen mit Ninhydrin anfärbbaren Fleck nachweisen, der beim Anfärben mit Malachitgrün und Rhodamin zuerst angefärbt wurde, beim Trocknen jedoch die Farbstoffe zerstörte und somit als weißer Fleck erschien. Die R_F-Werte waren bei aufsteigender Methode in Pyridin-Butanol-Wasser 0,48 und bei absteigender Methode in Pyridin-Butanol-Wasser-Dibutyläther 0,26. Sie stimmten mit den R_F-Werten von Lysophosphatidyläthanolamin überein, das aus synthetischem Phosphatidyläthanolamin durch Lagerung entstanden war.
- 3) Das IR-Spektrum (siehe Abb. 18, S. 30) ist charakterisiert durch die Bande der Esterphosphatide bei 1730 cm⁻¹ und eine der P=O Schwingung zuzuordnende Bande bei 1250 cm⁻¹. Eine Bande bei

84) M.M.RAPPORT u. B.LERNER, J.biol.Chemistry 232, 63 (1958)

*) berechnet für C₄₇H₉₅O₆N₂P

925 cm^{-1} wird auch im synthetischen DI- α -Kephalin gefunden. Ein Vergleichsspektrum konnte nicht angefertigt werden, da eine authentische Substanz nicht vorlag.

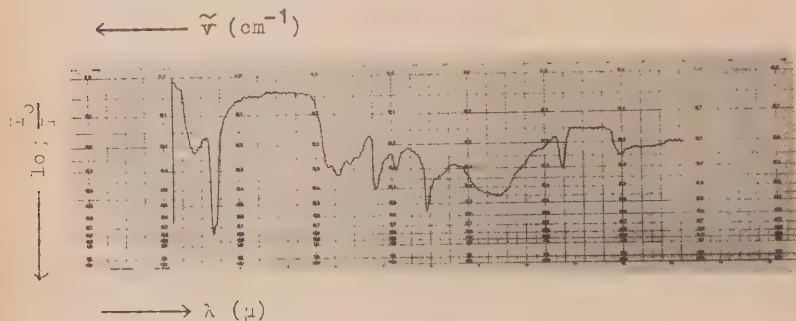


Abb. 16

IR-Spektrum der Substanz X (gemessen in CCl_4)

An Hand dieser Untersuchungen besteht die Vermutung, daß es sich bei der isolierten Substanz X um ein L y s o p h o s p h a - t i d y l ä t h a n o l a m i n handelt.

III. Identifizierung der Ganglioside I und II

- 1) Die Substanz wurde aus den Gläsern 1 bis 3 der zweiten Verteilung entnommen. Sie stellte ein weißes Pulver dar, das sich unter Lufteinfluß nicht veränderte. In Äther und Azeton war es unlöslich, gut löslich dagegen in einer Mischung aus Chloroform-Methanol.
- 2) Übereinstimmend mit den Beobachtungen von R. KUHN⁸⁵⁾ konnten wir die isolierte Substanz papierchromatographisch in zwei Bestandteile auftrennen. Bei aufsteigender Chromatographie in Pyridin-Butanol-Wasser erhielten wir zwei mit Rhodamin B anfärbbare Flecke mit den R_F -Werten für Gangliosid I 0,17 und für Gangliosid II 0,09, eine Beobachtung, die wir schon zu Beginn unserer Laufmittelversuche machten.

⁸⁵⁾ R.KUHN, Naturwissenschaften 46, 43 (1959)

Zur Charakterisierung führten wir die in der Tabelle 7 angegebenen Färbungen durch, wobei die Reaktionen der beiden Ganglioside übereinstimmten.

T a b e l l e 7

Substanz	Nin- hydr.	Phos- Mo.	Rhoda- min	Mala- chit	Fuchsin	Ammon. molyb.	OsO ₄	Nil- blau
isoliert	-	-	+	+	-	-	-	+
authentisch	-	-	+	+	-	-	-	+

- 3) Das IR-Spektrum (siehe Abb. 19) ist charakterisiert durch die Säureamid-(C=O-NH)-Banden I und II bei 1550 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} , wobei in diesem Falle wie bei authentischem Gangliosid die Bande II schwächer ausgebildet ist. Die für Esterphosphatide typische Bande bei 1730 cm^{-1} und die der P=O -Schwingung zugeordnete Bande bei 1250 cm^{-1} fehlen. Die zwischen 1020 und 1090 cm^{-1} liegende

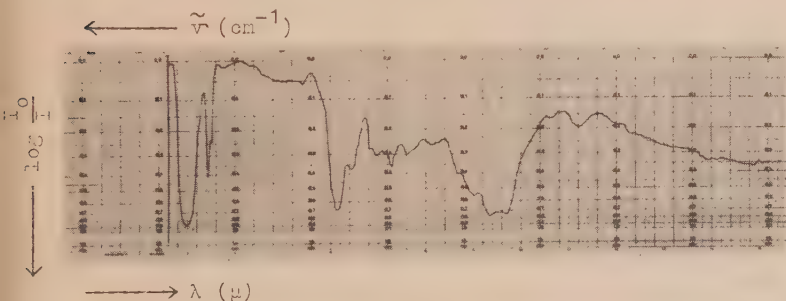


Abb. 19

IR-Spektrum der isolierten Ganglioside (gemessen auf KBr-Scheibe)

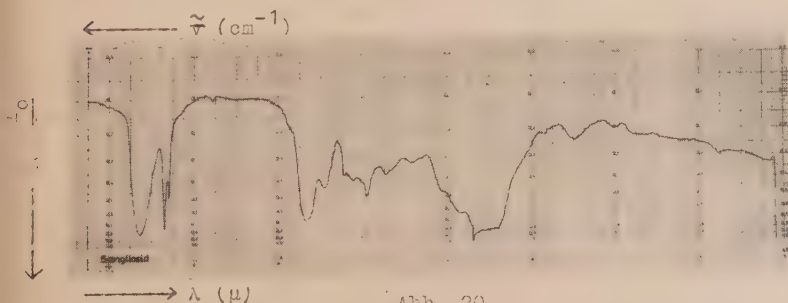


Abb. 20

IR-Spektrum von authentischem Gangliosid (gem. auf KBr-Scheibe)

Bande dürfte den C-O -Valenzschwingungen der enthaltenen Zucker zukommen. Das Vergleichsspektrum (siehe Abb. 20, S. 31) zeigt die Übereinstimmung der beiden Substanzen.

- 4) CH- und N-Bestimmungen wurden nicht durchgeführt. Eine Phosphorbestimmung erübrigte sich, da mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure bei der papierchromatographischen Untersuchung keine Reaktion eintrat. Nach McKibbin führten wir eine Galaktose-Bestimmung durch, die positiv verlief.
- 5) Die Hydrolyse ergab im wäßrigen Anteil Sphingosin und eine weitere Ninhydrin-positive Substanz. Beim Besprühen mit Silbernitratlösung wurde ein Hydrolyseprodukt auf der Höhe der Galaktose sichtbar. Eine Fettsäure konnte nachgewiesen, jedoch nicht näher identifiziert werden.

Abschließend läßt sich sagen, daß es sich bei den beiden isolierten Substanzen um die von R. KUHN⁸⁵⁾ beschriebenen Ganglioside handelt.

IV. Identifizierung von Cerebrosid I

Die Substanz Cerebrosid I erhielten wir aus den Elementen 61 bis 100 der ersten Verteilung V₁ und den ersten zwei Niederschlägen der fraktionierten Fällung der Substanz aus den Elementen 31 bis 60 der ersten Verteilung.

- 1) Die Substanz Cerebrosid I war ein weißes, fettartig sich anfühlendes Pulver, das sich an der Luft und am Licht nicht veränderte. Bei längerem Lagern ist die Substanz schwerer in Lösung zu bringen. Cerebrosid I löst sich bei Zimmertemperatur in einer Mischung aus Methanol-Chloroform, bei gelindem Erwärmen in Eisessig-Pyridin und Chloroform. Nach stärkerem Erwärmen löst es sich auch in Äthanol und Methanol. Aus den Alkoholen fällt Cerebrosid I beim Abkühlen in kugeligen Haufen aus.
- 2) Die papierchromatographische Untersuchung ergab einen Fleck, der folgende Reaktionen mit den in der Tabelle 8 angegebenen Reagenzien zeigte.

85) R. KUHN, Naturwissenschaften 46, 43 (1959)

T a b e l l e 8

Substanz	Ninh.	PhosMo	Rhod.	Malach.	Fuchsin.	Ammonmol.	OsO ₄	Nilblau
Cerebro- sid I isoliert	-	-	+	+	-	-	-	+
Cerebro- sid I authent.	-	-	+	+	-	-	-	+

Der R_F -Wert bei aufsteigender Chromatographie in Pyridin-Butanol-Wasser lag bei 0,85, bei absteigender Chromatographie in Pyridin-Butanol-Wasser-Dibutyläther bei 0,75. Beide Werte stimmten in der Laufhöhe und dem Verhalten mit dem von E. Klenk überlassenen Cerebrosid überein.

- 3) Das IR-Spektrum (siehe Abb. 21, S. 34) ist charakterisiert durch die für die Sphingolipide typischen Säureamidbanden I und II bei 1550 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} . Die für Esterphosphatide kennzeichnende Bande bei 1730 cm^{-1} fehlt, ebenso die Bande bei 1250 cm^{-1} , welche für eine P=O -Schwingung typisch wäre. Zum Vergleich wurde authentische Substanz ebenfalls spektroskopiert (siehe Abb. 22, S. 34).
- 4) Zur Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung wurden die in der folgenden Tabelle 9 zusammengefaßten Bestimmungen durchgeführt.

T a b e l l e 9

Substanz	% Stickstoff	% Phosphor	% Kohlenstoff	% Wasserstoff	% Zucker
isoliert	1,96	0,08	68,19	10,9	15
berechnet*)	1,725	-	70,87	11,54	22
authentisch ⁸⁶⁾	1,96	-	67,19	10,1	21

86) C.CHATAGNON u. P.CHATAGNON, Bull.Soc.Chim.biol. 37, 1305 (1955)

*) berechnet für Kerasin $\text{C}_{48}\text{H}_{93}\text{NO}_8$

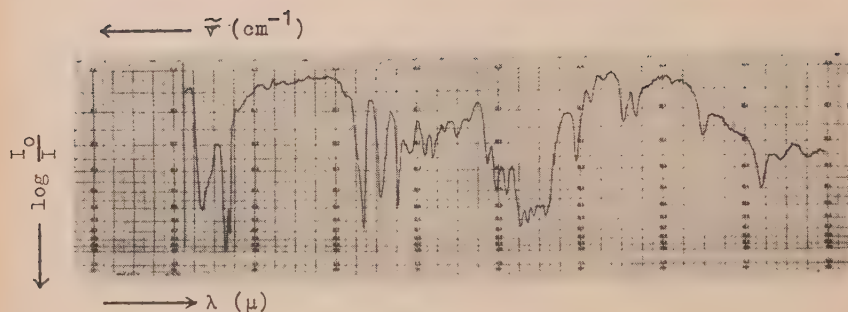


Abb. 21

IR-Spektrum des isolierten Cerebrosids I (gemessen auf KBr-Scheibe)

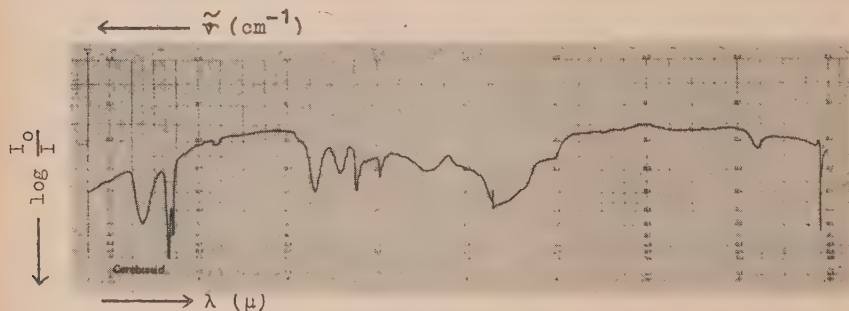


Abb. 22

IR-Spektrum von authentischem Cerebrosid (gemessen auf KBr-Scheibe)

- 5) Die Hydrolyse mit 6n Salzsäure über sechs Stunden bei 100° C erbrachte im wasserlöslichen Anteil als Zucker Galaktose und als Aminoalkohol Sphingosin. Die Hydrolyse mit 6n Kalilauge über sechs Stunden bei 100° C erbrachte im ätherlöslichen Anteil der Hydrolyse als Fettsäuren Lignocerin-, Cerebron- und Nervonsäure.

Bei der isolierten Substanz Cerebrosid I handelt es sich also, den Fettsäuren entsprechend, um Kerasin, Phrenosin und Nervon.

V. Identifizierung von Cerebrosid II

Die Substanz Cerebrosid II erhielten wir rein aus den Elementen 7 bis 12 der zweiten Verteilung V_2 , aus den Elementen 4 bis 6 vermisch mit den beiden Gangliosiden und aus den Elementen 13 bis 15 zusammen mit der Substanz X. Zur Untersuchung wurden nur die Reinsubstanzen verwendet.

- 1) Unsere Substanz war ein weißes, amorphes Pulver, das sich durch Luft und Licht nicht veränderte, lediglich schwerer löslich wurde. Sie löst sich bei Zimmertemperatur in einer Mischung aus Methanol-Chloroform, bei gelindem Erwärmen in Eisessig und Pyridin, nach längerem Erhitzen in Äthanol und Methanol. Aus den Alkoholen fällt Cerebrosid II beim Abkühlen in glitzernden, flachen Schuppen aus.
- 2) Die papierchromatographische Untersuchung ergab einen Fleck, der folgende Reaktionen mit den in der Tabelle 10 angegebenen Reagenzien zeigte.

T a b e l l e 10

Cerebrosid II	Wink.	PhosMo.	Rhod.	Malach.	Fuchsein.	Ammon-molyb.	OsO ₄	Nilblau
Isoliert	-	-	+	+	-	-	schwach	+

Der R_F -Wert bei aufsteigender Chromatographie in Pyridin-Butanol-Wasser war 0,6, bei absteigender Chromatographie in Pyridin-Butanol-Wasser-Dibutyläther 0,45.

- 3) Das IR-Spektrum (Abb. 23, S. 36) von Cerebrosid II ist charakterisiert durch die für Sphingolipide typischen Säureamidbanden bei 1550 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} . Die für Esterphosphatide kennzeichnende Bande bei 1730 cm^{-1} fehlt. Die sehr stark ausgeprägte Bande bei 1250 cm^{-1} ist hier nicht auf eine $\text{P}=\text{O}$ -Gruppierung zurückzuführen, sondern der $\text{S}=\text{O}$ -Gruppe eines Sulfatids zuzuordnen. Auffällig ist, daß die bei Cerebrosid I auftretende Bande bei 960 cm^{-1} fehlt.

Ein Vergleichsspektrum konnte nicht angefertigt werden, da keine authentische Substanz vorlag.

← $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)

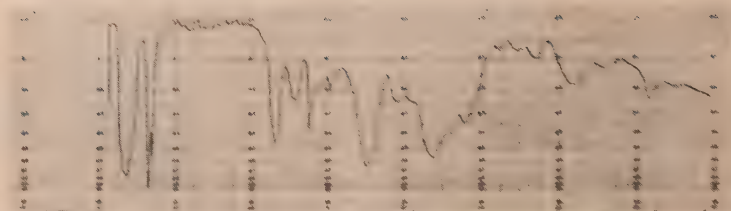


Abb. 23

IR-Spektrum des isolierten Cerebroside II (gemessen auf KBr-Schei-
be)

- 4) Für die Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung wurden die in der Tabelle 11 zusammengefaßten Bestimmungen durchgeführt und folgende Resultate erhalten:

Tabelle 11

Substanz	% Stickstoff	% Phosphor	% Kohlenstoff	% Zucker	% Schwefel	% Wasserstoff
isoliert *)	1,71	0	62,77	20,40	5,78	8,94
berechnet	1,71	0	64,61	20,19	5,78	10,00

- 5) Die Hydrolyse mit 6N Salzsäure über sechs Stunden bei 100° C erbrachte im wasserlöslichen Anteil als Zucker *Glucose*, als Aminoalkohol *Sphingosin* ($R_f = 0,31$) bei absteigender Methode in Butanol-Eisessig-Wasser, daneben eine Ninhydrin-positive Substanz mit dem R_f -Wert 0,81, bei der es sich vermutlich um Dihydrosphingosin handelt.

Die Hydrolyse mit 6N Kalilauge über sechs Stunden bei 100° C erbrachte im ätherlöslichen Teil der Hydrolyse als Fettsäuren *Lignocerin*-, *Cerebron*- und *Myovonsäure*.

*) berechnet für $C_{48}H_{97}O_{11}N_1S$ (Kerasinsulfat)

Über das Vorkommen schwefelhaltiger Ceretroside im gesunden Hirn⁸⁷⁾ und im Gehirn von Menschen, die an Leukodystrophie erkrankt waren⁸⁸⁾, sowie über Vorkommen im Rinderhirn⁸⁷⁾ wurde bereits berichtet. Ob die Ceretrosidsulfatide allerdings der alkalischen Hydrolyse widerstanden, war noch nicht erwiesen. Die Identifizierung der Substanz Ceretrosid II anhand der IR-Spektren war dabei erschwert durch das Zusammenfallen von S=O - und P=O - Schwingung⁸⁹⁾. Erst eine quantitative Phosphor- und Schwefelbestimmung konnte Klarheit bringen. Das Fehlen der Bande bei 960 cm^{-1} gegenüber dem IR-Spektrum von Ceretrosid I könnte dadurch erklärt werden, daß im Sphingosin anstelle einer CH=CH -trans- eine -cis-Konfiguration tritt oder die Doppelbindung vor der endständigen CH₃-Gruppe liegt.

Nach diesen Ergebnissen zu schließen, handelt es sich bei der isolierten Substanz Ceretrosid II um eine Mischung der Sulfatide des Kerasins, Phrenosins und Nervons*).

E. Grenzen des papierchromatographischen Nachweises der

Sphingolipide

Beim papierchromatographischen Nachweis der Sphingolipide während der Isolierungsarbeit oder der Identifizierung von Gesamtextrakten ist es wichtig, die unterste Grenze zu kennen, bei der die Nachweisreaktion eben noch anspricht. Rückschließend läßt sich damit die etwaige Konzentration der chromatographierten Substanzen abschätzen. Wir fertigten aus diesen Grunde Chromatogramme an, die quantitativ aufgetragene Lipidmengen enthielten. Die Chromatogramme wurden unter konstanten Bedingungen entwickelt und unter den gleichen Verhältnissen eingefärbt.

87) G.BLIX, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 219, 82 (1953)

88) H.JATZKEWITZ, *ibid.* 311, 279 (1958)

89) A.C.LLOYD, Nature (London) 184, 348 (1959)

*) Dieses Ergebnis konnte kürzlich an unserem Institut durch Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel-G-Platten bestätigt werden.

1. Nachweisgrenze bei aufsteigender Chromatographie

Zur Festlegung der kleinsten noch nachweisbaren Mengen wurden den Chromatogramme angefertigt, die 300 bis 1 oder 0,5 γ Lipoid trugen. Chromatographiert wurde aufsteigend auf Formaldehydpapier in Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25).

Beim Nachweis von Cerebrosid I, Cerebrosid II und Gangliosiden traten bei Mengen von 100 bis 300 γ Schwänze auf. Beim Auftragen von 100 γ Substanz konnten ziemlich langgezogene, aber klar umgrenzte Flecken beobachtet werden. Als Anfärbemittel war Rhodamin B zu bevorzugen, da bei der Färbung mit Nilblau und Amidoschwarz 10 B die unterste Nachweisbarkeitsgrenze bei 3 bis 4 γ lag, bedingt wohl durch die intensive Anfärbung des unliegenden Papiers. Bei der Färbung mit einer 0,01%igen Lösung von Rhodamin B gaben noch 1 γ Cerebrosid I oder Cerebrosid II eine deutliche rötliche Fluoreszenz im UV-Licht. Mengen zwischen 0,8 und 0,5 γ waren nicht mehr mit Sicherheit, und weniger Substanz war nicht mehr nachweisbar.

Beim Nachweis von Sphingomyelin konnten bei der Anfärbung mit Rhodamin B ebenfalls noch 1 γ Substanz erkannt werden. Die zur Identifizierung erforderliche zweite Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure erfolgte jedoch höchstens noch mit 5 γ Substanz. Geringere Mengen lassen sich mit Phosphormolybdänsäure nicht mehr nachweisen. Die Anfärbung mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure erforderte ebensoviel Substanz, um eine einwandfreie Färbung zu ergeben.

2. Nachweisgrenze bei absteigender Chromatographie

Wir chromatographierten absteigend auf Formaldehydpapier mit Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25) als Laufmittel. Bei der Anfärbung mit Rhodamin B ergaben sich als unterste noch nachzuweisende Substanzmenge für Cerebrosid I, Cerebrosid II, Ganglioside und Sphingomyelin 5 γ . Die weiteren Identifizierungen mit Phosphormolybdänsäure und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure hinkten auch hier nach, und erst Mengen von 12 bis 13 γ sind einwandfrei zu erkennen.

Zum Nachweis der Sphingolipide in Gesamtextrakten chromatographierten wir die Totalextrakte aus Diencephale, Retinale, Corale und Cerebrale. Hierbei zeigte es sich, daß bei auf- und absteigender Chromatographie die Cerebroside (Cerebrosid I), Ganglioside und das Sphingomyelin einwandfrei nachzuweisen waren. Die in geringerer Menge vorliegenden Cerebrosidsulfatide (Cerebrosid II) erschienen erst beim Auftragen großer Mengen Substanz und wurden dann meistens durch andere Lipide überdeckt. Für den einwandfreien Nachweis der Cerebrosidsulfatide mußte deshalb der Chromatographie eine milde alkalische Hydrolyse des Extraktes vorausgehen.

F. Untersuchung der grauen und weißen Substanz des Rinderhirns

Bei der Untersuchung des Lipidgehaltes von Menschenhirnen machten A. C. JOHNSON und Mitarbeiter⁹⁰⁾ die Beobachtung, daß sich die graue und weiße Hirnsubstanz in der prozentualen Zusammensetzung der Lipide sehr stark unterscheidet.

Wir trennten deshalb die beiden Gewebe und teilten sie papierchromatographisch auf. Das Rinderhirn wurde auf -30° C abgekühlt und graue und weiße Substanz herauspräpariert^{*)}). Nach dem oben angegebenen Verfahren zur Aufarbeitung des Gehirns wurden die Phosphatide möglichst weitgehend entfernt und dann die Sphingolipide mit heißem Äthanol extrahiert. Diese Fraktion wurde papierchromatographisch untersucht.

Übereinstimmend mit A. C. Johnson konnten wir feststellen, daß in der grauen Substanz mehr Cerebroside enthalten sind wie in der weißen. Ergänzend hierzu beobachteten wir, daß die weiße Gehirnssubstanz wesentlich mehr Sphingomyelin enthält. Am auffälligsten ist der sehr hohe Gehalt der grauen Substanz an Gangliosiden, während in der weißen Hirnsubstanz nur geringe Mengen Ganglioside aufzufinden sind.

90) A.C.JOHNSON, A.R.McNABB u. R.J.ROSSITER, Biochem.J. 43, 573 (1948)

*) Herrn Dr. Lang, Anatomisches Institut der Universität München, danken wir sehr herzlich für die Unterstützung bei der Präparation.

Experimenteller Teil

A. Papierchromatographie der Sphingolipide

1. Herstellung des Formaldehydpapiers

Die Auftrennung der Sphingolipide auf azetylierten, parafinierten oder durch Fällung von Silikaten hydrophobisierten Papieren war ungenügend. Wir verwendeten aus diesem Grunde mit Formaldehyd imprägniertes Papier⁹¹⁾.

Für die Herstellung des Papiers stand uns ein Autoklav aus V₄A-Stahl zur Verfügung, dessen höchstzulässiger Druck bei 12 at lag.

Das Chromatogrammpapier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 b Gl. schnitten wir längs der Laufrichtung in zwei Teile und rollten es zu einem Zylinder zusammen. Nachdem wir es zum Schutz mit Filtrierpapier umwickelten, wurde es in den Autoklaven gestellt. Die Imprägnierflüssigkeit aus

Formaldehyd sol. DAB 6 10 000 ml

Eisessig 500 g

Ammoniumrhodanid 20 g

gossen wir zu und ließen das Papier 30 Minuten quellen. Wir erhitzen auf 150° C, wodurch der Druck auf 12 at anstieg. Innerhalb von 3 Stunden blieb der Druck unverändert, während die Temperatur auf 135° C abfiel. Hierauf wurde abgeschaltet. Nach 12 Stunden betrug die Temperatur noch 35° C, das Manometer stand auf 3 at. Wir saugten das den Druck erzeugende Gas ab und entnahmen das Papier zum Wässern. Das Papier wurde 3 Tage in einem Bassin mit fließendem Wasser belassen, dabei öfters umgewendet. Das imprägnierte Papier wurde an der Luft getrocknet, kurz über Dampf gehalten und dann zum Glätten beschwert.

2. Papierchromatographische Methode

Die aufsteigende Methode über 20 cm verwendeten wir bei Substanzen, aus denen durch Hydrolyse Lecithin entfernt worden war

91) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

(siehe S. 45), um damit in kurzer Zeit eine Übersicht über eine Verteilung oder Füllung zu erhalten. Die Laufzeit der zu einem Zylinder zusammengerollten Chromatogramme betrug bei Verwendung der Oberphase eines Gemisches aus Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25) bei Zimmertemperatur etwa 6 Stunden.

Für die Untersuchung von Gesamtextrakten und Substanzen, bei denen Lecithin vorhanden war, verwendeten wir die absteigende Methode über 50 cm. Als Laufmittel wurden 20 Teile Oberphase des Pyridin-Butanol-Wasser-Gemisches und 5 Teile Dibutyläther genommen. Die Laufzeit beträgt etwa 15 Stunden. Es war uns damit möglich, Lecithin und Sphingomyelin zu trennen, ferner konnten größere Mengen Substanz aufgetragen werden, als bei aufsteigender Chromatographie.

3. Färbemethoden der Sphingolipide

- a) Bei der Entwicklung mit N i n h y d r i n werden Aminosäuren, Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin sichtbar.
- b) Die Entwicklung mit P h o s p h o r m o l y b d ä n s ä u r e wurde meist an die Ninhydrin-Entwicklung angeschlossen. Die cholinhaltigen Lipide lassen sich nach der Reduktion mit SnCl_2 -Lösung an der Blaufärbung der zurückgehaltenen Phosphormolybdänsäure erkennen. Sollten nur cholinhaltige Substanzen angefärbt werden, so mußte zuerst mit Ninhydrin angefärbt werden, da sonst auch Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin blau angefärbt wurden, wenn auch nur sehr schwach.

Wurde auf Cholin im Hydrolysat geprüft, so wurde die Phosphormolybdänsäure auf das Chromatogramm aufgesprüht, eine Viertelstunde einwirken gelassen, dann der Überschuß im stehenden Wasser ausgewaschen und getrocknet. Hierauf wurde die Stannochloridlösung sparsam aufgesprüht. Im Überschuß der Stannochloridlösung ist nämlich der Cholin-Molybdänblaukomplex löslich, ebenso wird Cholin mit viel Wasser aus dem Papier ausgewaschen.

- c) Eine 0,01%ige R h o d a m i n - B - Lösung färbt alle Lipide und Lysoverbindungen rot an. Beim Trocknen zerstören dann die Lysoverbindungen an der Luft den absorbierten Farbstoff und erscheinen als weiße Flecke, unter dem UV-Licht als tiefdunkelblaue Flecke.

- d) Eine 0,05%ige Lösung von M a l a c h i t g r ü n gibt diesen Effekt der Farbstoffzerstörung noch ausgeprägter.
- e) Mit O s m i u m t e t r o x y d wurde der Nachweis der ungesättigten Plasmale und Fettsäuren in gebundener und freier Form durchgeführt. Auf die getrockneten Chromatogramme ließen wir etwa 30 Minuten den Dampf von OsO_4 einwirken. Durch die reduzierende Eigenschaft der Doppelbindungen wird aus OsO_4 elementares Os als anfänglich brauner, dann schwarz werdender Fleck abgeschieden.
- f) Fettsäuren und Phosphatidylserin reagieren mit K u p f e r - a z e t a t - K a l i u m f e r r o c y a n i d . Wir tauchten dazu die Chromatogramme 15 Minuten in eine 1%ige Lösung von Kupferazetat, wuschen anschließend 5mal 5 Minuten mit Wasser aus und legten sie 10 Minuten in eine 1%ige Kaliumferrocyanidlösung. Die Fettsäuren und Phosphatidylserin erschienen als rotbraune Flecke.
- g) Mit A m m o n i a k a l i s c h e r S i l b e r n i t r a t - l ö s u n g wurden Inosit und Zucker nachgewiesen. Die getrockneten Chromatogramme besprühten wir kräftig mit einer Lösung aus

Silbernitrat	0,35 g
Ammoniaklösung 25%	25 ml
Wasser	ad 100 ml
NaOH in rot.	4 g.

Nach etwa 5minütigem Trocknen an der Luft färbt sich das Chromatogramm hellgelb. Nun wird über strömendem Dampf gehalten, wodurch eine beschleunigte Reduktion eintritt. Es entstehen braunschwarze Abscheidungen von Silber. Zur Fixierung wird das Chromatogramm in eine 10%ige Natriumthiosulfatlösung getaucht und ohne Auswaschen getrocknet.

Dieser Nachweis ist auf Formaldehydpapier wegen der reduzierenden Eigenschaft des Papiers nicht möglich.

- h) A m m o n i u m m o l y b d a t - P e r c h l o r s ä u r e - L ö s u n g reagiert mit allen phosphorsäurehaltigen Verbindungen. Die Chromatogramme werden mit einer Lösung aus

Ammoniummolybdatlösung(4%)	25 ml
n Salzsäure	10 ml
Perchlorsäure(72%)	5 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

besprüht. Zur Hydrolyse der Phosphorsäureester werden die Chromatogramme 7 Minuten bei 85° C erhitzt. Anschließend hält man die Chromatogramme in strömenden Wasserdampf und reduziert in H₂S oder unter der UV-Lampe. Alle Phosphorester geben einen kräftigen blauen Fleck auf rötlichem Grund. Die freie Phosphorsäure gibt schon nach dem Erhitzen einen gelbgrünen Fleck und kann daran erkannt werden.

B. Darstellung der Sphingolipide aus dem Rinderhirn

Um Veränderungen in der Substanz durch Lagerung zu vermeiden, wurden alle drei Monate 5 kg frisches Rinderhirn verarbeitet.

1. Vorextraktionen zur Entfernung der Phosphatide

Das Zerkleinern der Rinderhirne erfolgte sofort nach dem Töten der Tiere. Die 5 kg Hirn wurden 10 Minuten in Azeton bei -30° C gelegt und dann das anhaftende Blut und die Häute entfernt. Unter Einblasen von Stickstoff wurde im Multimix zu einer breiigen Masse zerkleinert. Für möglichst vollständigen Lichtschutz wurde durch Verdunkeln des Arbeitsraumes gesorgt.

Zum Entwässern gaben wir zu einem Teil der breiigen Masse einen Teil trockenes Azeton. Nach 48stündigem Stehen unter Stickstoffatmosphäre dekantierten wir das überstehende Azeton und behandelten wie oben. Nach dem dritten Entwässerungsvorgang saugten wir auf der Nutsche kräftig ab. Den Rückstand von 2200 g Gewebe überführten wir in einen Perkulator.

Die Extraktion mit Azeton erfolgte 15mal mit einem Teil kaltem Azeton. Es wurde ebenfalls Stickstoff eingeblasen, was zur Bewegung der Extraktionsmasse beitrug. Nach jedem Ablassen des Azetons aus dem Perkulator wurde abgesaugt. Das Azeton wurde durch Destillation und anschließende Entwässerung wiedergewonnen. Der dabei anfallende Rückstand von Neutralfetten und Cholesterin wurde verworfen. Das zurückbleibende Gewebe hatte ein Gewicht von 1327 g.

Die Extraktion mit Äther wurde auf dieselbe Weise wie bei der oben erwähnten Azetonextraktion durchgeführt. Die 1327 g Gewebe wurden 15mal mit je 2 Teilen kaltem Äther extrahiert. Das soweit vorbereitete Hirn wurde nunmehr in eine doppelwandige Säule überführt, deren unteres Ende durch eine Glassinterplatte G 2 verschlossen war. Durch die Doppelwand der Säule strömte Wasser, das durch einen Thermostaten auf konstanter Temperatur gehalten wurde. Wir extrahierten einen Tag lang mit 5 Liter Äther von 32-34° C. Nach dem Ablassen des Äthers wurde 2 Stunden bei derselben Temperatur Stickstoff durchgeblasen zur Entfernung des restlichen Äthers. Es resultierten 850 g entwässertes und vorextrahiertes Gewebe.

2. Extraktion der Sphingolipide

Das vom Großteil der Phosphatide befreite Gewebe (850 g) wurde nun 10mal mit je einem Teil Äthanol von 73-76° C extrahiert. Während der Extraktion wurde von Zeit zu Zeit durch ein im Extraktionsgut steckendes Glasrohr Stickstoff eingeblasen. Dadurch wurde Sauerstoff ferngehalten und gleichzeitig die Substanz in Bewegung gehalten. Nach jedem Liter durchgelaufenen Alkohols wurde abgesaugt. Die heiße, alkoholische Lösung wurde sofort durch Vakuumdestillation auf 1/4 ihres ursprünglichen Volumens gebracht und im Kühlschrank bei 0° C einen Tag stehen gelassen. Die ausgefallenen Sphingolipide wurden abzentrifugiert und bei Zimmertemperatur im Vakuum über CaCl_2 getrocknet. Die Mutterlauge wurde verworfen, da sie hauptsächlich zersetzte Phosphatide enthielt. Der trockene Niederschlag wurde nochmals einen Tag mit 2 Liter Äther im Soxhlet extrahiert. Die weiße Masse, welche zurückblieb, wurde 12 Stunden im Vakuumtrockenschrank über CaCl_2 belassen. Das aus Rohsphingolipiden bestehende Pulver wurde unter Stickstoff bei -30° C aufbewahrt.

Wir erhielten aus den 5 kg Rinderhirn etwa 275 g Rohsphingolipide. 575 g Gewebe blieben zurück, die mit den besprochenen Methoden nicht weiter extrahiert werden konnten.

In der folgenden schematischen Übersicht sind der beschriebene Extraktionsgang und die daraus erhaltenen Substanzen nochmals zusammenfassend dargestellt:

Ausgangsmaterial g	Extraktion mit	zurückbleibendes Gewebe g	gewonnene Substanz g
5 000	Azeton (Entwäss.)	2 200	-
2 200	Azeton	1 327	873
1 327	Äther	850	477
850	Äthanol, heiß	575	275

3. Milde alkalische Hydrolyse der Rohsphingolipide

Zur Zerstörung von Phosphatidylcholin, Lyso-Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin wurde hydrolysiert.

10 g Rohsphingolipid wurden mit 150 ml n-methanolischer Kalilauge 24 Stunden bei 37° C am Rückflußkühler hydrolysiert. Die Hydrolyseflüssigkeit wurde durch ein Rührwerk in Bewegung gehalten. Nach 24 Stunden ließen wir erkalten und neutralisierten die Hydrolyseflüssigkeit mit n Salzsäure. Nach dem Versetzen mit der doppelten Wassermenge destillierten wir im Vakuum den größten Teil des Methanols ab. Wir ließen über Nacht bei +1° C stehen und zentrifugierten den Bodensatz ab. Die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert, chromatographiert und, da sie keine wesentlichen Bestandteile mehr enthielt, verworfen. Die am Boden des Zentrifugenglases haftende Substanz wurde mit destilliertem Wasser aufgewirbelt und abermals zentrifugiert. Die resultierende Substanz (9,3 g) wurde gefriergetrocknet.

Der Gefrier Trocknungsapparat bestand aus einer Kühlfalle, auf die 2 Rundkolben mit der Substanz gesteckt wurden. Die Kühlfalle hing in einen Dewargefäß mit Flüssiger Luft. Mit einer Ölvakuumpumpe wurde in der Kühlfalle ein Vakuum erzeugt.

4. Säulenchromatographie der Sphingolipide nach der milden alkalischen Hydrolyse

Die wasserlöslichen und die Ninhydrin-positiven Spaltprodukte entfernten wir durch eine Verteilungschromatographie.

Wir füllten in eine Säule von 4 cm Durchmesser und 40 cm Länge 40 g Formaldehydzellulose (Herstellung siehe 5., S. 46)

und wuschen mit 250 ml einer Mischung aus

Chloroform DAB 6	80 ml
Methanol	20 ml
Wasser	2,5 ml

durch. 5 g der gefriergetrockneten Substanz wurden in 100 ml der obigen Mischung gelöst und auf die Säule gegeben. Es wurde mit einer Tropfgeschwindigkeit von 2 ml pro Minute eluiert und in Fraktionen zu 25 ml aufgefangen. Nach dem Durchlaufen von 300 ml Lösungsmittel war keine Lipoidsubstanz mehr zu eluieren. Nach der Reinigung über die Zellulosesäule erhielten wir aus den ursprünglichen 5 g Substanz 4 g gereinigte Sphingolipide.

5. Herstellung der Formaldehydzellulose

Zur Bereitung wurde ein V₄A-Autoklav mit Rührwerk verwendet, dessen höchstzulässiger Druck bei 12 at lag.

1000 g Zellulosepulver der Firma Schleicher und Schüll Nr. 123 a wurden eingefüllt und die Imprägnierflüssigkeit aus

Formaldehyd	10 000 ml
Eisessig	500 ml
Ammoniumrhodanid	20 g

zugegeben. Unter öfterem Umrühren wurde 30 Minuten quellen gelassen. Es wurde unter Rühren 3 Stunden auf 150° C und 12 at belassen. Hierauf schalteten wir ab und ließen über Nacht abkühlen.

Die Formaldehydzellulose wurde in einen 10-Liter-Perkolator überführt und 3 Tage mit fließendem Wasser ausgewaschen. Hierauf wurde im Vakuum-Trockenschrank bei 60° C das Wasser entfernt und anschließend im Perkolator mit 10 Liter einer Mischung verschiedener organischer Lösungsmittel durchgespült. Dadurch wurden Reste polymerisierten Formaldehyds entfernt, die sonst bei der Eluierung aus der Säule stören würden. Es wurde nochmals bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet. Das weiße, derbe Zellulosepulver roch ganz schwach nach Formaldehyd. Es hat den Vorteil, daß mit Wasser kaum eine Quellung eintritt, die Tropfgeschwindigkeit wesentlich erhöht und mehr Substanz aufgetragen werden kann.

C. Isolierung der Sphingolipide

1. Erste multiplikative Verteilung der Sphingolipide nach der milden alkalischen Hydrolyse

Durch milde alkalische Hydrolyse waren Phosphatidylcholin, Lyso-Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin aus dem Rohextrakt entfernt worden. Die so vorgereinigte Substanz wurde zur Auftrennung einer multiplikativen Verteilung in der vollautomatischen Craig-Apparatur unterworfen. Das Verteilungssystem, bestehend aus

Äther	4 500 ml
Methanol	4 500 ml
Petroläther (Sdp 35-50°)	5 000 ml
Wasser	900 ml

wurde zur Absättigung 30 Minuten geschüttelt und in Ober- und Unterphase getrennt. Diese Mischung reicht für eine Verteilung über 130 Schritte bei einem Phasenvolumen von 50 ml.

Die Oberphase ließen wir bis Element 6 über die eingefüllte Unterphase vorauslaufen. Wir entnahmen aus Element 3 das Lösungsmittel und lösten darin die 8 g vorgereinigten Lipide durch gelindes Erwärmen. Diese Lösung wurde sofort wieder eingefüllt. Bis Verteilungsschritt 10 mußte leicht erwärmt werden, da sonst Ausflockungen zu beobachten waren. Die Wartezeit zwischen dem 40maligen Schütteln betrug bis Element 10 3 bis 5 Minuten, von Element 11 bis 130 eine halbe bis eine Minute. Emulsionen traten nicht auf. In den ersten Schritten waren leichte Phasenverschiebungen zu beobachten, die sich aber nach einiger Zeit selbst behoben.

Zur Papierchromatographie wurden je zwei Ober- und Unterphasen in einem 250 ml-Stehkolben zusammengefaßt. Das Lösungsmittel wurde bei 30° C und 120 - 30 Torr im Vakuum-Trockenschrank über CaCl₂ abdestilliert. Die Rückstände der Fraktionen wurden in 5 ml einer Mischung aus Methanol-Chloroform (2+3) gelöst und aufsteigend chromatographiert.

Es ergab sich folgendes Bild: Die Elemente 3-6 enthielten ca. 2 g Substanz, bestehend aus Gangliosiden, Lyso-Phosphatidyl-

Äthanolamin und Cerebrosid II, in 7-14 liegen 1 g Cerebrosid II und Lyso-Phosphatidyläthanolamin, in 15-30 0,3 g reines Sphingomyelin, das in Element 31-60 mit Cerebrosid I verunreinigt 3,5 g Substanz ausmacht. Die Gläser 61-100 lieferten 1 g Cerebrosid I. Die Elemente 101-130 waren leer oder enthielten Neutralfette.

Nach dem Entfernen der Reinsubstanzen blieben 2 gemischte Fraktionen zurück, die weiterbearbeitet wurden:

1. Fraktion V_1/I Element 3 - 6 mit ca. 2 g Substanz,
2. Fraktion V_1/II Element 31 - 60 mit 3,5 g Substanz.

2. Zweite multiplikative Verteilung der Sphingolipide nach der milden alkalischen Hydrolyse

Durch Vorversuche in der 30stufigen Hecker'schen Apparatur gelang es uns, ein geeignetes Verteilungssystem zu finden. Das Gemisch aus

Methanol	2 860 ml
Chloroform	1 650 ml
Petroläther (Sdp 30-50°)	5 500 ml
Wasser	220 ml

wurde wie bei der ersten Verteilung vorbereitet. Wir füllten 43 Unterphasen ein und ließen bis Element 6 Oberphase vorauslaufen. In Element 3 wurden 2 g Substanz V_1/I eingefüllt und die Verteilung fortgesetzt. Die Wartezeit betrug von Anfang an $1/2$ bis 1 Minute. Emulsionen und Verschiebungen traten nicht ein. Von den nach 43 Elementen überlaufenden Oberphasen wurden je 5 Stück zusammengefaßt, abdestilliert und sicherheitshalber chromatographiert. Sie enthielten jedoch keine Substanz.

Wie sich im Vorversuch gezeigt hatte, war die Löslichkeit in Ober- und Unterphase sehr verschieden. Zur Chromatographie wurden deshalb Ober- und Unterphasen getrennt aufgefangen, schonend zur Trockene gebracht und anschließend chromatographiert. Es kam folgendes Verteilungsbild zustande: Die Hauptmenge der Sphingolipide befand sich in den Unterphasen, während Substanz X über beide Phasen gleichmäßig verteilt ist. Die Elemente 1-3 enthielten ca. 10 mg Ganglioside, 4-6 eine Mischung mit Cerebrosid II, 7-12 etwa 0,3 g reines Cerebrosid II, dann folgte in

13-15 Cerebrosid II und Substanz X gemischt, bis Glas 30 war dann reine Substanz X vorhanden.

3. Fraktionierte Fällung der Substanz V₁/II

Obwohl wir 15 verschiedene Lösungsmittelsysteme bei der multiplikativen Verteilung zur Trennung von Cerebrosid I und Sphingomyelin erprobten, gelang es uns nicht, eine befriedigende Auftrennung der beiden Substanzen zu erzielen. Wir griffen deshalb zu einem Fällungsverfahren, in dem Cerebrosid I rein erhalten wird. Hierzu wurden die aus V₁ anfallenden 3,5 g Substanz in 70 ml einer Mischung von Methanol-Chloroform (8+2) gelöst und 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das abgeschiedene weiße Pulver wurde abzentrifugiert und im Vakuum-trockenschrank über CaCl₂ bei Zimmertemperatur getrocknet. Es waren etwa 1,5 g Substanz Cerebrosid I. Zur Mutterlauge wurden nochmals 35 ml des Lösungsmittelgemisches gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei +1° C stehen gelassen. Die abgeschiedenen, kugeligen Lipide wurden abzentrifugiert und ebenfalls getrocknet. Es resultierten nochmals 0,5 g Cerebrosid I. Aus der restlichen Flüssigkeit wurden 0,5 g einer Mischung aus Cerebrosid I und Sphingomyelin durch einstündiges Stehen bei -10° C abgeschieden. In der Mutterlauge blieben etwa 0,5 g Sphingomyelin, das mit wenig Cerebrosid I verunreinigt war. Der Rest verblieb in der Mutterlauge.

Es gelang, mit Hilfe von zwei multiplikativen Verteilungen und einer fraktionierten Fällung folgende Substanzen aus 8 g Rohsphingolipiden zu isolieren:

Ganglioside	0,010 g
Sphingomyelin	0,9 g
Cerebrosid I	3,0 g
Cerebrosid II	0,8 g,

daneben noch Substanz X in nicht festgestellter Menge und Fraktionen, die je zwei der oben angegebenen Reinsubstanzen enthielten (siehe Isolierungsschema, S. 50).

Schema der Sphingolipid-Isolierung

Vorextraktion zur Entfernung der Phosphatide

Rinderhirn (5000 g)

1. Entwässerung mit Azeton — verworfen
↓ 2 200 g Gewebe
2. Extraktion mit Azeton — verworfen
↓ 1 327 g Gewebe
3. Extraktion mit Äther — verworfen
↓ 850 g Gewebe
4. Extraktion mit Äthanol
↓ 575 g Gewebe — verworfen

Extraktion der Sphingolipide (roh)

Rohsphingolipide (275 g)

Davon verarbeitet
Rohsphingolipide (10 g)

Reinigung von Phosphatiden

5. milde alkalische Hydrolyse
↓ 9,3 g Sphingolipide + Spaltprodukte

6. Reinigung an einer Formaldehyd-Zellulosesäule
↓ 8,0 g Sphingolipide

Isolierung der einzelnen Sphingolipide

7. erste multiplikative Verteilung

Reinsubstanzen von

Sphingomyelin (0,3g)
Cerebrosiden (1,0g)

Mischung von

Gangliosiden
Cerebrosidsulfat
Lyso-Phosphatidyl-
äthanolamin
(2,0g)

Mischung von

Cerebrosiden
Sphingomyelin
(3,5g)

8. zweite multiplikative Verteilung

9. fraktionierte Fällung

Reinsubstanzen von

Gangliosiden (0,01g)
Cerebrosidsulfat (0,8g)
Lyso-Phosphatidyl-
äthanolamin (0,01g)

Mischfraktion von

Cerebrosidsulfat
Lyso-Phosphatidyl-
äthanolamin

Reinsubstanzen von

Sphingomyelin (0,6g)
Cerebrosid (2,0g)

D. Identifizierung der Sphingolipide

- 1) Die während der Verarbeitung der Substanzen gemachten Erfahrungen in bezug auf Farbe, Zustand und Zersetzlichkeit, sowie Löslichkeit der einzelnen Lipide wurden zusammenfassend dargestellt.
- 2) Zur papierchromatographischen Identifizierung wurde nach der auf Seite 43 unter B. 1. beschriebenen Methode verfahren. Wir trugen zur Chromatographie Mengen von 10-100 γ auf, um evtl. nur in Spuren vorhandene Verunreinigungen zu erfassen. Bei der Anfärbung wurden die angegebenen Zeiten genau eingehalten, um gleiche Färbebedingungen zu erhalten. Als Testsubstanzen wurden die auf Seite 57 zusammengestellten Substanzen verwendet.
- 3) Die IR-Spektren wurden in einem IR-Spektrophotometer Perkin-Elmer Nr. 21 ausgemessen. Die Substanzen wurden in eine Kaliumbromidscheibe eingebettet oder, wie bei Substanz X, in CCl_4 gelöst.

Zur Ausmessung wurden die in der folgenden Tabelle 12 zusammengefaßten Mengen verwendet.

T a b e l l e 12

Substanz	Phase	$\gamma/\text{mg KBr}$	Bemerkungen
Sphingomyelin	KBr	4308 γ /150 mg KBr	kompensiert
Sphingomyelin,*) authentisch	KBr	2800 γ /300 mg KBr	-
Substanz X	CCl_4	0,2 mm Dicke	Substanz in 0,25 ml gelöst
Ganglioside I+II	KBr	370 γ /100 mg KBr	auf Spalt gepreßt
Ganglios.auth.*)	KBr	-	-
Cerebrosid I	KBr	3066 γ /300 mg KBr	-
Cerebros.auth.*)	KBr	120 γ /100 mg KBr	-
Cerebrosid II	KBr	1300 γ /300 mg KBr	-

*) siehe Seite 57

4) Zur Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung wurden die unter a) bis d) folgenden Bestimmungen durchgeführt.

a) CH- und Schwefelbestimmungen wurden bei A. BERNHARDT im Mikroanalytischen Laboratorium des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr durchgeführt. Die Trocknung erfolgte bei 90°C im Hochvakuum. Folgende Werte wurden erhalten:

T a b e l l e 13

Substanz	Einwaage mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	% C	% H	Verbrauch ml n/50Jod	% S
Cerebrosid I	4,026	10,06	3,92	68,19	10,90	-	-
Cerebrosid II *	4,136	9,21	3,59	62,77	9,71	-	-
Sphingomy- elin	2,977	7,18	2,90	65,82	10,90	-	-
Cerebrosid II	4,642	-	-	-	-	0,46	3,18

b) Der Phosphorgehalt *) wurde durch nasse Veraschung der Phosphatide und Überführen des Phosphats in den Molybdänblaukomplex bestimmt. Der Komplex wird mit Natriumazetat haltbar gemacht und im Zeiss-Spektrophotometer Opton MQ4 bei 578 mμ gegen einen Blindwert gemessen.

Die hier aufgeführten Werte wurden aus den isolierten Substanzen bestimmt, gemessen gegen einen Standard von 5γ P = 0,5 E, wobei

$$\text{Phosphor \%} = \frac{\text{Extinktion} \cdot 10}{0,4 \cdot \text{Einwaage}} \text{ ist.}$$

T a b e l l e 14

Substanz	mg Einwaage	Extinktion	γ Phosphor	% Phosphor
Cerebrosid I	5,71	0,02	4,5	0,08
Cerebrosid II	3,54	0	0	0

*) nach einer Laboratoriumsvorschrift der Firma Boehringer, Tutzing, die uns dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurde.

- c) Der Stickstoffgehalt wurde nach I. K. PARNASS und R. WAGNER⁹²⁾ im Mikrokjeldal-Apparat bestimmt. Als Indikator diente eine Mischung von Methylenblau-Methylrot. Die aus den isolierten Substanzen erhaltenen Werte sind folgende:

T a b e l l e 15

Substanz	mg Einwaage	Verbrauch ml n/100 HCl	γ Stickstoff	% Stick- stoff
Cerebrosid I	3,85	0,54	75,5	1,96
Cerebrosid II	4,09	0,50	69,9	1,71

- d) Der Galaktosegehalt wurde nach S. MALLOV, J. M. McKIBBIN, J. S. ROBB⁹³⁾ bestimmt. Das Lipoid wurde naß hydrolysiert, neutralisiert, die Verunreinigungen durch Ammoniumreineckat ausgefällt und hierauf zu einer volumetrischen Lösung ergänzt, ein aliquoter Teil mit Anthronlösung versetzt und die nach kurzem Erhitzen entstehende grüne Farbe im Zeiss-Spektrophotometer Opton MQ4 gegen einen Blindwert bei 620 mμ gemessen. Aus der auf wasserfreie Galaktose-d(+) berechneten Eichkurve entnehmen wir die entsprechenden Galaktosewerte.

Extinktion:	0,2	0,4	0,6	0,8
γ Galaktose:	36	72	108	144

T a b e l l e 16

Substanz	mg Einwaage	Extinktion	γ Galaktose	% Galaktose
Cerebrosid I	5,5	0,76	137	15,6
Cerebrosid II	4,41	0,8	144	20,4

- 5) Zur Ergänzung der papierchromatographischen und quantitativen Untersuchungen wurden die Sphingolipide einer Hydrolyse unterworfen. Es konnten dabei Galaktose, Phosphorsäure, die Aminobasen Cholin und Sphingosin, phosphorsäurehaltige Spaltprodukte und verschiedene

92) I.K.PARNASS u. R.WAGNER, Biochem.Z. 125, 253 (1921)

93) S.MALLOV, J.M.McKIBBIN u. J.S.ROBB, J.biol.Chemistry 201, 825 (1953)

Fettsäuren nachgewiesen werden. Zur Hydrolyse wurden die Sphingolipide, etwa 15-100 mg, in 10 ml 6n methanolischer Kalilauge durch längeres Schütteln und Erhitzen gelöst oder möglichst fein suspendiert. Die resultierende Suspension hydrolysierten wir 6 Stunden unter Umrühren am Rückfluß auf dem Wasserbad. Nach der Zugabe von 50 ml Wasser zur Hydrolyseflüssigkeit säuerten wir mit verdünnter Salzsäure an und schüttelten 3mal mit je 50 ml Äther aus. Die Ätherlösung wurde 2mal mit Wasser gewaschen und konnte nach dem Einengen zur Fettsäurebestimmung aufgetragen werden.

Der wäßrige Teil der Hydrolyse und das Waschwasser wurden mit Eisessig versetzt und unter Einblasen von Luft auf dem Wasserbad zur Trockene gebracht⁹⁴⁾. Die Zugabe einer wäßrigen Eisessiglösung wurde noch 2mal wiederholt. Die Salzsäure war darnach völlig entfernt. Den Rückstand lösten wir in 5 ml Wasser und untersuchten papierchromatographisch auf wasserlösliche Bestandteile.

a) Papierchromatographie des ätherlöslichen Hydrolyseanteils

Die Fettsäuren wurden auf paraffingetränktem Papier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 b G1 chromatographiert. Zur Imprägnierung stellten wir das zylindrisch zusammengerollte Papier in eine Lösung von:

Paraffinum liqu. DAB 6	10 Teile
Benzin(Sdp 50-75)	90 Teile

und ließen die Flüssigkeit bis zum oberen Rand durchlaufen, was etwa 10 Stunden in Anspruch nahm. Nach dem Verdunsten des Benzins an der Luft wurden die Testsubstanzen und die ätherische Hydrolyseflüssigkeit aufgetragen.

Die zur Chromatographie verwendete Methode richtete sich nach der hydrolysierten Substanz und der daraus nachzuweisenden Fettsäuren. Mußten geradzahlige gesättigte Fettsäuren von C₁₀ bis C₂₀ nachgewiesen werden, so chromatographierten wir bei Zimmertemperatur (20°C) mit paraffingesättigtem Eisessig über eine Strecke von 20-22 cm. Bei einer Laufzeit von ca. 8 Stunden erhielten wir folgende R_F-Werte:

Stearinsäure:	0,40
Lignocerinsäure:	0,00

94) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u.J.HÖLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)

Zur Identifizierung der geradzahligen, ungesättigten und gesättigten Fettsäuren von C₁₈ bis C₂₆ mußten höhere Temperaturen angewandt werden. Zur weiteren Erhöhung der Löslichkeit wurden nach H. P. KAUFMANN und E. MOHR⁹⁵⁾ als Laufmittel ein Gemisch aus Azeton-Eisessig-Wasser (35+10+15) benutzt, das mit Paraffin gesättigt war. Das Chromatogramm wurde in einem auf 45° gehaltenen Gefäß entwickelt. Zur Trennung der in Frage kommenden Fettsäuren genügte eine Laufhöhe von 20 cm. Die Entwicklungszeit betrug ca. 2 1/2 Stunden. Für die Lignocerin säure erhielten wir mit dieser Methode einen R_F-Wert von 0,24.

Die einfach ungesättigte 15,16-Tetracosensäure, auch als Nervonsäure bezeichnet, erlangt durch ihre Doppelbindung den R_F-Wert von 0,35. Dies entspricht dem R_F-Wert einer gesättigten C₂₂-Fettsäure. Wir chromatographierten also auch hier bei 45° und verwendeten Behensäure, Docosansäure, als Testsubstanz.

Cerebronsäure, eine α -Hydroxylignocerin säure, hatten wir als Reinsubstanz vorliegen. Sie zeigte die Eigenschaften einer C₁₈-Fettsäure und wurde deshalb ebenfalls im System Azeton-Eisessig-Wasser bei 45° chromatographiert. Der R_F-Wert der Cerebronsäure betrug 0,48.

Die etwa einer C₁₂-Fettsäure entsprechende Oxy nervonsäure, eine α -Hydroxy-15,16-tetracosensäure, konnte papierchromatographisch nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

In Abbildung 24 sind die R_F-Werte der verschiedenen chromatographierten Fettsäuren übersichtlich dargestellt:

95) H.P.KAUFMANN u. E.MOHR, Fette, Seifen einschl.Anstrichmittel
2, 165 (1958)

0 4	0 3 0 2 0 1
------------	----------------------------

I

II

Abb. 24

Chromatogrammschema der ätherlöslichen
Hydrolysenprodukte

I = Fließmittel: paraffingesättigter
Eisessig bei Zimmer-
temperatur

II = Fließmittel: Azeton-Eisessig-Wasser
bei 45° entwickelt

1 = Lignocerinsäure

2 = Nervensäure

3 = Cerebronsäure

4 = Stearinsäure

Die Anfärbung der Fettsäuren erfolgte
mit Kupferazetat-Kaliumferrocyanid,
oder wenn es die Konstitution der Fett-
säure erlaubte, mit Osmiumtetroxyd.

b) Papierchromatographie der wasserlöslichen Bestandteile der
Hydrolyse

Die wasserlöslichen Hydrolysenprodukte wurden auf unbehandel-
tem Papier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 b G1 chromato-
graphiert. Zur Feststellung der Aminosäuren und von Cholin wurde
in Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5), zur Identifizierung der Zucker
in Isopropanol-Eisessig-Wasser (3+1+1) und zur Erkennung der phos-
phorhaltigen Bruchstücke in Methanol-Isopropanol-Ammoniak(5%) (30+
5+15) chromatographiert. Wir ließen jeweils bei Zimmertemperatur
über eine Strecke von 30 cm laufen, dafür waren etwa 12 Stunden
nötig. Nach dem Trocknen wurde mit Ninhydrin-Silbernitrat- oder
Ammoniummolybdatlösung entwickelt (siehe S. 12).

E. Papierchromatographische Untersuchung der grauen und weißen
Substanz des Rinderhirns

Rinderhirn frisch geschlachteter Tiere wurde in der Kühl-
truhe bei -30° C abgekühlt. Nach dem Säubern wurden 30 g weiße
und 20 g graue Substanz herauspräpariert. Die beiden Anteile

wurden getrennt verarbeitet.

Nach dem Zerkleinern im Multimix versetzten wir 2mal 1 Stunde mit der doppelten Menge Azeton. Zur Beschleunigung der Entwässerung wurde geschüttelt. Die entwässerte Masse wurde auf einer Nutsche abgepreßt und in die doppelwandige Extraktionssäule überführt. Wir extrahierten 15mal mit 1 Teil Azeton und 10mal mit 2 Teilen Äther. Hierauf wurde nochmals mit 10mal 2 Teilen heißem Äther von 32-34°C nachextrahiert. Das so vorbereitete Hirn wurde 10mal mit 2 Teilen Äthanol von 73-76°C extrahiert. Die heiße alkoholische Lösung wurde auf 1/4 ihres ursprünglichen Volumens gebracht und über Nacht bei +1° C stehen gelassen. Das abgeschiedene weiße Pulver wurde abzentrifugiert und bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet.

Zur Chromatographie trugen wir etwa 20-100 γ Substanz auf. Die Substanzen wurden aufsteigend in Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25) und absteigend in einem Gemisch aus 5 Teilen Dibutyläther und 20 Teilen Oberphase aus Pyridin-Butanol-Wasser (7+25+25) chromatographiert.

F. Vergleichssubstanzen für die Papierchromatographie

Sphingomyelin erhielten wir von Herrn Professor Dr. E. Stotz, Rochester, N.Y. oder erwarben es käuflich von der Firma Light u. Co.

Cerebrosid erhielten wir von Herrn Professor Dr. E. Klenk, Köln.

Gangliosid erhielten wir von Herrn Professor Dr. E. Klenk, Köln.

L- α -Kephalin erwarben wir käuflich von der Firma Fluka, A.G. Buchs/Schweiz (Produktenverzeichnis 1); in dieser Charge war auch das wohl durch Lagerung entstandene Lyso-Kephalin enthalten.

Stearin-, Lignocerin- und Behensäure, sowie Inosit, Glukose-1- und Glukose-6-Phosphat, Glycerinphosphorsäure und die Aminosäuren bezogen wir von der Firma C. Roth, Karlsruhe.

Cerebronsäure erhielten wir von Herrn Professor Dr. Chatagnon, Neuilly-sur-Marne.

L e b e n s l a u f

Am 13. August 1931 wurde ich als Sohn des Stadtoberinspektors Otto Wieland und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Zoebelin, in Göppingen geboren. Die ersten Jahre meiner Kindheit verbrachte ich in Göppingen, UHINGEN und WELZHEIM. Nach dem vierjährigen Besuch der Volksschule in WELZHEIM trat ich im Herbst in die Oberschule ein. Nach der Rückkehr meines Vaters aus der Kriegsgefangenschaft verzogen wir 1947 nach Göppingen, wo ich an der Oberschule 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Meine Berufsausbildung begann ich mit einer zweijährigen Praktikantenzeit in der Apotheke in Boll. Nach dem pharmazeutischen Vorexamen im September 1953 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen das Studium der Pharmazie auf und legte im Oktober 1956 das pharmazeutische Staatsexamen ab. Nach dem Kandidatenjahr in Reutlingen erhielt ich im Oktober 1957 die Bestallung als Apotheker.

Im November 1957 heiratete ich Fräulein Ursula Sengle aus Tübingen. Im August 1959 wurde uns ein Sohn geboren.

Unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ludwig Hörhammer begann ich im November 1957 am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit der vorliegenden Arbeit. Sie wurde im Dezember 1959 abgeschlossen.

An obigem Institut war ich ab November 1958 als wissenschaftliche Hilfskraft tätig. Seit Januar 1959 bin ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.

